



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y GENÉTICA

CURSO 2020-2021

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**ESTUDIO DE LA GENOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDOS METÁLICOS EN LEUCOCITOS EXTRAÍDOS A PARTIR DE
MUESTRAS DE SALIVA.**

**GENOTOXICITY STUDY OF METAL OXIDE NANOPARTICLES IN
LEUKOCYTES ISOLATED FROM SALIVA SAMPLES**

**ESTUDO DA XENOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDOS METÁLICOS EN LEUCOCITOS EXTRAÍDOS A PARTIR DE
MOSTRAS DE SALIVA**

Vº Bº Directoras del Trabajo

VALDIGLESI
AS GARCIA
VANESSA -
47364761X

Firmado digitalmente
por VALDIGLESIAS
GARCIA VANESSA -
47364761X
Fecha: 2021.07.15
21:22:42 +02'00'

Dra. Dña. *Vanessa Valdiglesias García*

LAFFON
LAGE
BLANCA -
32814183Z

Firmado
digitalmente por
LAFFON LAGE
BLANCA - 32814183Z
Fecha: 2021.07.15
18:31:53 +02'00'

Dra. Dña. *Blanca Laffon Lage*

Raquel Rodríguez Fernández

Julio 2021

ÍNDICE

RESUMEN	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
1. Nanomateriales y nanotecnología	4
2. Nanopartículas de óxidos metálicos	6
2.1 Nanopartículas de dióxido de titanio	6
2.2 Nanopartículas de óxido de zinc	7
2.3 Nanopartículas de dióxido de cerio.....	7
3. Toxicidad general	8
3.1 Fuentes de exposición y vías de entrada.....	9
3.1.1 Inhalación	9
3.1.2 Ingestión	9
3.1.3 Contacto dérmico	10
3.2 Genotoxicidad	10
3.2.1 Daño primario en el ADN.....	11
3.2.2 Daño oxidativo en el ADN.....	13
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
1. Obtención y procesamiento de las muestras.....	16
2. Suspensiones de las nanopartículas: preparación y caracterización	17
3. Tratamientos	18
4. Evaluación de la viabilidad celular.....	19
5. Ensayo cometa alcalino	19
6. Ensayo cometa modificado con hOGG1.....	21
7. Análisis estadístico	22
RESULTADOS	23
1. Caracterización de las nanopartículas.....	23
2. Evaluación de la viabilidad celular.....	24
3. Evaluación del daño primario: Ensayo cometa alcalino	24
4. Evaluación del daño oxidativo: Ensayo cometa modificado con hOGG1.....	26
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34

RESUMEN

Las nanopartículas (NP) de óxidos metálicos poseen una amplia variedad de propiedades físico-químicas y biológicas muy útiles para aplicaciones industriales y prácticas biomédicas, y constituyen una tecnología emergente en pleno desarrollo. Como resultado, la exposición humana a estos nanomateriales es muy frecuente, resultando un asunto de preocupación para la salud pública, ya que existen hasta la fecha datos escasos acerca de su seguridad y posibles efectos tóxicos.

Los leucocitos salivales humanos se han propuesto recientemente como alternativa no invasiva a los leucocitos extraídos de sangre periférica para evaluar la genotoxicidad *in vitro*. El presente trabajo se ha centrado en demostrar la idoneidad de los leucocitos salivales como biomatriz en el ensayo del cometa para llevar a cabo estudios de nanogenotoxicidad *in vitro*, mediante la evaluación de algunas de las NP de óxidos metálicos presentes con mayor frecuencia en productos de consumo: NP de dióxido de titanio (TiO₂), óxido de zinc (ZnO) y dióxido de cerio (CeO₂). Se evaluaron el daño primario y oxidativo en el ADN inducido por estas NP mediante metodologías basadas en el ensayo del cometa: la versión alcalina estándar y la versión modificada con la enzima hOGG1, respectivamente. Previamente al análisis de la genotoxicidad, se descartó la existencia de cualquier posible interferencia de las NP con el procedimiento metodológico del ensayo y con la actividad de la enzima hOGG1. Los resultados obtenidos mostraron aumentos significativos tanto del daño primario como del daño oxidativo en el ADN tras los tratamientos con las tres NP.

Los datos de este trabajo apoyan el uso de los leucocitos salivales como muestra biológica adecuada y sensible para realizar estudios de nanogenotoxicidad *in vitro*, y contribuyen a incrementar el conocimiento acerca del impacto de las NP de óxidos metálicos sobre la salud humana, reforzando la necesidad de una regulación específica sobre el uso de nanomateriales.

RESUMO

As nanopartículas (NP) de óxidos metálicos posúen unha ampla variedade de propiedades físico-químicas e biolóxicas moi útiles para aplicacións industriais e prácticas biomédicas, e constitúen unha tecnoloxía emerxente en pleno desenvolvemento. Como resultado, a exposición humana a estes nanomateriais é moi frecuente, resultando un asunto de preocupación para a saúde pública, xa que existen ata o de agora datos escasos acerca da súa seguridade e posibles efectos tóxicos.

Os leucocitos salivais humanos propuxéronse recentemente como alternativa non invasiva aos leucocitos extraídos de sangue periférico para avaliar a xenotoxicidade *in vitro*. O presente traballo centrouse en demostrar a idoneidade dos leucocitos salivais como biomatriz no ensaio do cometa para levar a cabo estudos de nanoxenotoxicidade *in vitro*, mediante a avaliación dalgunhas das NP de óxidos metálicos presentes con maior frecuencia en produtos de consumo: NP de dióxido de titanio (TiO_2), óxido de zinc (ZnO) e dióxido de cerio (CeO_2). Avaliáronse o dano primario e oxidativo no ADN inducido por estas NP mediante metodoloxías baseadas no ensaio do cometa: a versión alcalina estándar e a versión modificada coa enzima hOGG1, respectivamente. Previamente á análise da xenotoxicidade, descartouse a existencia de calquera posible interferencia das NP co procedemento metodolóxico do ensaio e coa actividade da encima hOGG1.

Os resultados obtidos amosaron aumentos significativos tanto do dano primario como do dano oxidativo no ADN tralos tratamentos coas tres NP. Os datos deste traballo apoian o uso dos leucocitos salivais como mostra biolóxica adecuada e sensible para realizar estudos de nanoxenotoxicidade *in vitro*, e contribúen a incrementar o coñecemento acerca do impacto das NP de óxidos metálicos sobre a saúde humana, reforzando a necesidade dunha regulación específica sobre o uso de nanomateriais.

ABSTRACT

Metal oxide nanoparticles (NP) possess a wide variety of physico-chemical and biological properties very useful for industrial applications and biomedical practices, and constitute an emerging technology in growing development. As a result, human exposure to these nanomaterials is highly frequent, becoming an issue of concern to public health since data on their safety and possible toxic effects are scarce so far.

Human salivary leukocytes have recently been proposed as a non-invasive alternative to peripheral blood leukocytes to evaluate genotoxicity *in vitro*. The present study focused on proving the suitability of salivary leukocytes as a biomatrix in the comet test for *in vivo* nanogenotoxicity studies, by testing some of the metal oxide NP most frequently present in consumer products: titanium dioxide (TiO₂), zinc oxide (ZnO) and cerium dioxide (CeO₂) NP. Primary and oxidative DNA damage induced by these NP were evaluated using the comet assay-based methodologies: the standard alkaline version and the hOGG1 enzyme-modified version, respectively. Any possible interference of the NPs with the methodological procedure or the hOGG1 activity was addressed before performing genotoxicity evaluation.

Results showed significant increases in both primary and oxidative DNA damage after treatments with the three NP. These data support the use of salivary leukocytes as a proper and sensitive biological sample for *in vitro* nanogenotoxicity studies, and contribute to increase the knowledge on the impact of metal oxide NP on human health, reinforcing the need of a specific regulation on nanomaterials use.

INTRODUCCIÓN

1. Nanomateriales y nanotecnología

La Iniciativa Nanotecnológica Nacional (NNI, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, define nanotecnología como “*la ciencia, ingeniería y tecnología desarrollada en la nanoescala (1-100 nm), donde fenómenos característicos posibilitan aplicaciones novedosas en un amplio espectro de campos; desde la química, física y biología, hasta la medicina, ingeniería y electrónica*”. De este modo, mientras que la nanociencia hace referencia al estudio de las estructuras y moléculas definidas dentro de la escala nanométrica, la tecnología que la traduce en aplicaciones prácticas y se sirve de sus características especiales, se corresponde con el ámbito de la nanotecnología (Bayda *et al.*, 2019). Ha sido el estudio exhaustivo de la nanociencia básica, el que ha posibilitado el desarrollo de la nanotecnología a lo largo de las últimas dos décadas.

Esta tecnología de nueva era se basa en el desarrollo y empleo de estructuras nanométricas: los nanomateriales. La ASTM Internacional (*American Society for Testing and Materials*) define a la nanoestructura como “*aquel material en el que al menos una de sus 3 dimensiones (altura, anchura o longitud) mide entre 1–100 nm*”. A modo comparativo, podemos tomar como referencia el grosor de un cabello humano, equivalente a 60000 nm, o el radio de una cadena de ADN de doble hélice, de aproximadamente 2 nm (Bayda *et al.*, 2019) (Figura 1).

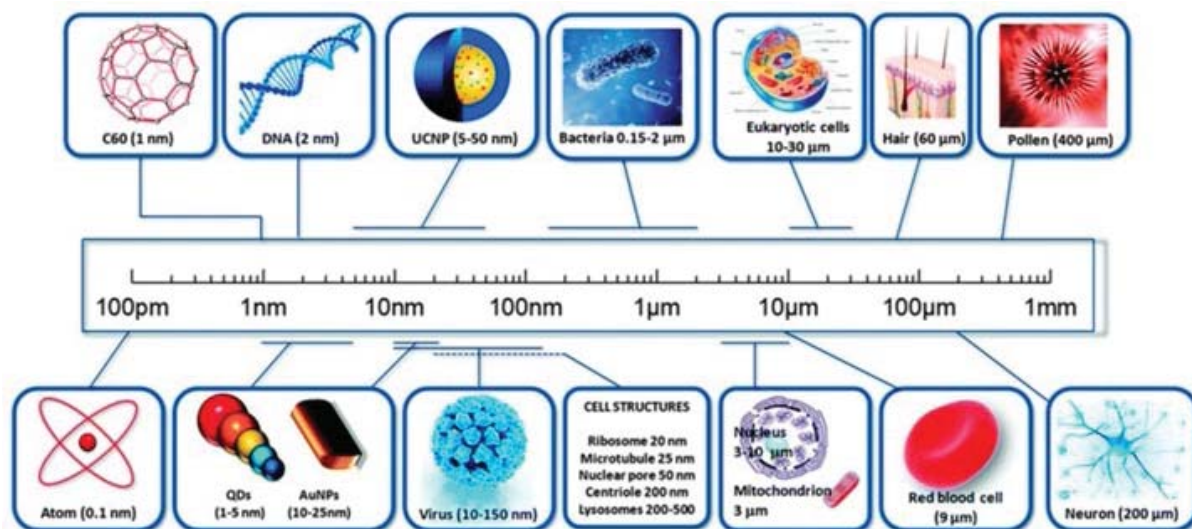


Figura 1. Escala métrica comparativa de diferentes nanomateriales y estructuras biológicas. Fuente: Gnach *et al.* (2015).

Los nanomateriales presentan propiedades físicoquímicas y biológicas muy interesantes debido a la reducción de tamaño de macro a nanoescala, relativas a su resistencia, conductividad, reactividad o longevidad, entre otras (Demir 2020). Algunas de las características asociadas a este tipo de materiales, que explican dichas propiedades, incluyen la forma, el área superficial y el revestimiento externo. Estas características pueden ser moduladas, alterando con ello las propiedades exhibidas por el material; por lo tanto, se pueden diseñar nanomateriales más avanzados con propiedades personalizadas (Atluri *et al.*, 2017).

Existen diversas formas de clasificar a los nanomateriales en distintas categorías, atendiendo a parámetros como su tamaño, composición, forma u origen (natural o sintético). No obstante, una de las más importantes es atendiendo a sus dimensiones (Sudha *et al.*, 2018):

- Nanomateriales de dimensión 0: Todas sus dimensiones se encuentran dentro de la nanoescala, *e.g.* nanopartículas.
- Nanomateriales unidimensionales: Dos dimensiones se encuentran dentro de la nanoescala, *e.g.* nanotubos y nanofibras de carbono.
- Nanomateriales bidimensionales: Una de las tres dimensiones se encuentra dentro de la nanoescala (son materiales en forma de láminas), *e.g.* grafeno y nanofilms.
- Nanomateriales tridimensionales: No tienen ninguna dimensión en la nanoescala, *e.g.* materiales nanoestructurados y dispersiones de nanopartículas.

Las vertientes nanotecnológicas actuales abarcan aplicaciones en la industria textil, la producción energética, la conservación de alimentos, la construcción, así como aplicaciones en el ámbito de las redes de comunicación, seguridad o cosmética (Demir 2020). En el ámbito clínico, la aplicación de la nanotecnología ha dado lugar al origen de una disciplina en sí misma: la nanomedicina. Los potenciales beneficios diagnósticos y/o terapéuticos derivados del empleo de nanomateriales en el campo médico los convierten en objeto de prometedoras líneas de investigación dirigidas al tratamiento y detección tumoral, la medicina regenerativa, así como el desarrollo de agentes antibacterianos o vehículos para la administración dirigida de fármacos.

A medida que el impacto de la nanotecnología ha ido aumentando en los últimos años y la presencia de los nanomateriales se ha hecho cada vez más ubicua en nuestra sociedad, la preocupación respecto a los posibles riesgos para la salud derivados de la exposición continuada a los mismos, ha generado interrogantes en torno a su seguridad y posibles efectos tóxicos sobre los tejidos, células y microambiente (Demir 2020, Akçan *et al.*, 2020), en especial si se tiene en cuenta su creciente aplicación en el campo biomédico.

2. Nanopartículas de óxidos metálicos

A grandes rasgos, las nanopartículas (NP) se caracterizan por presentar una elevada área superficial por unidad de masa debido a su pequeño tamaño. El número de átomos en la superficie aumenta exponencialmente a medida que disminuye el tamaño (Magdolenova *et al.*, 2014) (Figura 2). Como resultado se obtiene una alta energía superficial, que provoca que las nanopartículas sean muy reactivas en los sistemas biológicos (Chan 2006).

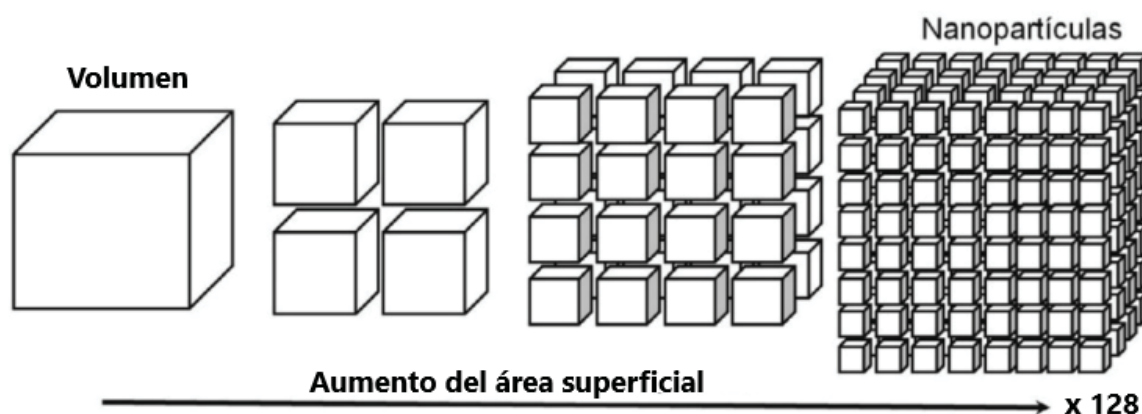


Figura 2. Relación tamaño-área superficial de las nanopartículas. A medida que el volumen se divide en unidades más pequeñas, la superficie total aumenta. Modificada de Róz *et al.* (2015).

Este estudio se centra en tres tipos de NP de óxidos metálicos que en la actualidad están muy presentes en distintos productos de consumo disponibles en el mercado: dióxido de titanio (TiO_2), óxido de zinc (ZnO) y dióxido de cerio (CeO_2).

2.1 Nanopartículas de dióxido de titanio

El TiO_2 se utiliza en una amplia variedad de aplicaciones industriales y médicas. En la parte más industrial aporta blancura y opacidad a productos como pinturas, plásticos, papeles, tintas y alimentos; también se puede encontrar en productos de cuidado personal como pastas dentífricas y protectores solares debido a sus propiedades fotocatalíticas, biocidas y antiproliferativas (Chen *et al.*, 2014).

En el sector farmacéutico, las NP de TiO_2 se emplean como agentes fotosensibilizantes en el tratamiento de tumores malignos, así como en la inactivación fotodinámica de bacterias resistentes a los antibióticos (Ziental *et al.*, 2020). Esta aplicación se debe a la capacidad que poseen estos nanomateriales de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) al ser iluminadas con luz ultravioleta (UV), induciendo así la muerte celular.

Debido a que presentan una elevada heterogeneidad, durante los últimos años se han llevado a cabo estudios para conocer su potencial toxicidad (Shi *et al.*, 2013). Las NP de TiO₂ tienen una gran relación superficie / masa y un alto potencial redox, que puede provocar efectos no deseados en la salud humana y en el medio ambiente (Chen *et al.*, 2014).

2.2 Nanopartículas de óxido de zinc

Las nanopartículas de óxido de zinc se emplean en diversos productos de cuidado personal como cosméticos, pasta de dientes y bloqueadores solares físicos inorgánicos gracias a sus propiedades antimicrobianas y protectoras contra los rayos ultravioletas. En las composiciones de los protectores solares se suele utilizar una combinación de partículas nanométricas de ZnO y TiO₂ para asegurar una protección UV de banda ancha (Smijs *et al.*, 2011).

Gracias a sus propiedades ópticas, semiconductoras y piezoeléctricas, son un nanomaterial muy adecuado para fabricar nanosensores, dispositivos nanoeléctricos, pilas de combustible y circuitos microeléctricos (Kalpana *et al.*, 2018). A pesar de que en los últimos años las NP de ZnO han tenido más desarrollo en los campos de los sistemas biomédicos, electrónicos y ópticos, también se pueden encontrar en pinturas, aditivos y envases alimentarios, productos textiles, plásticos y materiales de construcción (Kalpana *et al.*, 2018; Valdiglesias *et al.*, 2013a).

En el sector médico se han aplicado ampliamente en diagnósticos, terapias y sistemas de administración de fármacos por su elevada biocompatibilidad (Choi *et al.*, 2014). Gracias a su pequeño tamaño, las NP pueden penetrar a través de los capilares más pequeños y ser internalizadas por las células, lo que permite una acumulación eficiente del fármaco en los sitios diana (Kalpana *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha demostrado que el uso de las NP de ZnO es una prometedora alternativa para combatir bacterias resistentes a múltiples fármacos y prevenir la formación de biofilms (Lallo da Silva *et al.*, 2019).

2.3 Nanopartículas de dióxido de cerio

Las nanopartículas de dióxido de cerio, también conocidas como *nanoceria*, tienen una amplia utilidad en diferentes campos. En primer lugar, estas NP son potenciales agentes terapéuticos porque poseen una propiedad antioxidante única que les confiere la capacidad de regenerar su superficie. Ésta se basa en la relación Ce⁺³/Ce⁺⁴, ya que el dióxido de cerio puede tener dos formas de óxido diferentes: CeO₂ con Ce en estado de oxidación +4 o Ce₂O₃ con Ce

en estado de oxidación +3, y tanto Ce^{+3} como Ce^{+4} pueden coexistir en su superficie (Charbgoon *et al.*, 2017).

De esta manera, son ideales para tratar enfermedades relacionadas con la producción de ROS, como por ejemplo las neurodegenerativas (*e.g.* las enfermedades de Parkinson o Alzheimer), ya que el cerebro es uno de los órganos que sufre un estrés oxidativo más elevado. Su mecanismo de actuación consistiría en eliminar las ROS o reducir su formación (Charbgoon *et al.*, 2017; Naz *et al.*, 2017). En consecuencia, se puede asegurar que estas NP son poderosas imitaciones de las enzimas del organismo involucradas en la defensa contra el estrés oxidativo: la catalasa y la superóxido dismutasa. Estas aplicaciones biomédicas establecen ciertos desafíos que es necesario afrontar para utilizar de manera segura y eficaz estas NP, por lo que, el estudio de su toxicidad resulta muy relevante en este campo.

En segundo lugar, las *nanocerias* se han utilizado para aplicaciones de pulido de vidrio y pulido químico mecánico (Walkey *et al.*, 2015). Además, también ha surgido un interés considerable para utilizarlas como aditivo de combustible diésel, a fin de reducir las emisiones de partículas, y aumentar la eficiencia del combustible (Dale *et al.*, 2017).

3. Toxicidad general

El estudio centrado en la determinación de los efectos adversos de los nanomateriales sobre la salud y el medio ambiente recibe el nombre de Nanotoxicología, y requiere de un abordaje multidisciplinar que abarca ramas como la toxicología, la física, la química o la ciencia de materiales (Akçan *et al.*, 2020).

Estos abordajes, que tienen por cometido la evaluación de su bioseguridad, han de tener en cuenta cuestiones relativas a las características del nanomaterial analizado que, en última instancia, son responsables de las propiedades que exhibe (tamaño, forma, carga o área superficial), el tejido u órgano con el que interacciona, y las rutas de entrada que el nanomaterial sigue para acceder al organismo sobre el que se pretende evaluar el riesgo.

Como se ha detallado previamente, las distintas NP de óxidos metálicos se encuentran ampliamente integradas en los procesos industriales y en las investigaciones biomédicas. Debido a ello, los estudios nanotoxicológicos resultan prioritarios y muy necesarios para investigar a fondo los posibles efectos adversos que los nanomateriales puedan ocasionar en la salud humana derivados de su exposición.

3.1 Fuentes de exposición y vías de entrada

La inhalación constituye la ruta de entrada más común de los nanomateriales y la mejor estudiada, por lo que, está considerada como la vía principal no intencional. No obstante, los nanomateriales también pueden acceder al organismo a través de su ingesta, el contacto con la piel o por vía parenteral mediante la inyección (Akçan *et al.*, 2020; Mortezaee *et al.*, 2019).

3.1.1 Inhalación

Tras la inhalación, el pulmón es el órgano que se ve principalmente afectado. Debido a su pequeño tamaño, la penetrancia de las NP en el tejido pulmonar es mayor que la de las partículas inhaladas de mayor tamaño, conduciendo a la disfunción alveolar (Akçan *et al.*, 2020).

Penetrando por la vía respiratoria, las NP pueden alcanzar el sistema circulatorio, y desde allí interaccionar con múltiples órganos, induciendo inflamación y con ello la producción de especies reactivas como radicales libres, genotóxicos bien caracterizados debido a su capacidad para afectar al material genético. Adicionalmente, se ha señalado el alcance potencial del cerebro y su consecuente exposición a estrés oxidativo, a través del nervio olfativo (Mortezaee *et al.*, 2019).

3.1.2 Ingestión

Los nanomateriales desempeñan múltiples papeles en la industria alimentaria, desde potenciadores de sabor, color y textura, a la mejora en la biodisponibilidad de los nutrientes, o aplicaciones relativas al empaquetado y conservación (Sohal *et al.*, 2018). La evaluación de la toxicidad en este apartado resulta muy amplia, porque la exposición se puede dar de dos maneras diferentes: por NP que son empleadas intencionalmente en los procesos industriales alimentarios, o mediante NP que contaminan los alimentos de manera accidental, a través de su presencia en el aire se depositan en frutas y verduras o en el agua que es absorbida por las plantas.

Otro aspecto a tener en cuenta, es que la toxicidad derivada de la ingestión puede ser directa a través del consumo de productos alimentarios o mediante la ingestión secundaria de partículas inhaladas (Akçan *et al.*, 2020), en la que, la vía inhalatoria juega un papel esencial, reafirmandose como vía de entrada principal.

El conocimiento que se tiene respecto a la toxicocinética y toxicodinámica de los nanomateriales empleados como aditivos alimentarios, todavía se encuentra en vías de desarrollo. Recientemente, y debido a la importante fuente de exposición que constituye para la mayor parte de la población, se ha sugerido la necesidad de profundizar en el análisis del impacto que puedan tener estos nanomateriales en el tracto gastrointestinal (Sohal *et al.*, 2018).

3.1.3 *Contacto dérmico*

La exposición por contacto directo con la piel responde al uso habitual de productos, generalmente de higiene y cuidado personal, cuya composición, de forma sistemática, incluye nanomateriales, y más concretamente nanopartículas. Entre ellos destacan cosméticos como lociones, cremas y protectores solares, dentífricos y algunos medicamentos (Akçan *et al.*, 2020).

Habitualmente, las nanopartículas se acumulan a nivel dérmico o del estrato córneo, pero el alcance al torrente sanguíneo a través de esta vía de acceso queda sujeto a factores como el mecanismo de penetración asociado a la nanopartícula y al estado de la piel expuesta. En general, la penetración de sustancias tóxicas a través de la piel es complicada debido, precisamente, a las características principales de este órgano: la piel está formada por diversas capas celulares gruesas, siendo necesario que el agente tóxico tenga un fuerte carácter lipófilo para poder atravesar una gran cantidad de membranas plasmáticas antes de alcanzar a los vasos sanguíneos que se encuentran bajo la dermis, además de que ésta es una zona poco irrigada en general.

3.2 *Genotoxicidad*

La genotoxicidad es la propiedad de aquellos compuestos que, a nivel subtóxico, pueden producir algún tipo de modificación en el material genético por interacción directa con el ADN u otras moléculas que están involucradas en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Diversos tipos de daño que pueden inducirse en el ADN: roturas de cadena sencilla y doble, entrecruzamientos, lugares sensibles al álcali, mutaciones puntuales o aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. La evaluación de genotoxicidad resulta de vital importancia, ya que los daños en ADN pueden conducir al desarrollo de enfermedades graves como el cáncer o diversas enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Srivastava *et al.*, 2016).

En relación a los mecanismos de genotoxicidad de las NP, éstos pueden producir daño genético primario o secundario. La **genotoxicidad directa** requiere una interacción directa entre las NP y el material genético, provocando un daño físico. Esto podría derivar en roturas de cadena o mutaciones debido a reparaciones propensas a errores o por desplazamiento de la pauta de lectura, debido al tamaño de la NP, ya que podría actuar como un agente intercalante en el ADN (Magdolenova *et al.*, 2014).

La **genotoxicidad indirecta** propone a las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por NP como un mecanismo clave para causar daño en el material genético. Hasta la fecha, algunas investigaciones han revelado que el daño en el ADN asociado a la exposición a NP ocurre a través de este método, por lo tanto, es el foco dominante en la nanogenotoxicología actualmente. En este caso, las NP no interactúan físicamente con el ADN, sino que promueven el daño mediante la producción excesiva de otras moléculas, como las ROS, que tienen la capacidad de interactuar con el ADN, induciendo lesiones o interfiriendo con la replicación del ADN (Evans *et al.*, 2017). Esto se relaciona directamente con la razón superficie/volumen de las NP y su alta reactividad superficial, de modo que, aquellas de menor tamaño exhiben un mayor potencial de producción de ROS (Demir 2020).

La mayoría de las NP metálicas son capaces de producir radicales libres directamente mediante la liberación de iones metálicos e interacciones con moléculas de agua. El aumento de la producción de radicales libres y la muerte celular causada por las NP, pueden estimular reacciones redox (reducción / oxidación), lo que lleva a un circuito de retroalimentación positiva por la producción endógena continua de ROS (Mortezaee *et al.*, 2019).

Actualmente, se dispone de una amplia gama de metodologías de evaluación genotóxica, entre las cuales se encuentran el test de micronúcleos, el ensayo de fosforilación de H2AX, los intercambios entre cromátidas hermanas y el ensayo del cometa. No obstante, y aunque cada una de ellas puede resultar ventajosa en función de las particularidades del estudio a desarrollar, en este trabajo destacamos el ensayo del cometa como una prometedora herramienta en la evaluación del daño genético inducido por NP de óxidos metálicos.

3.2.1 Daño primario en el ADN

El ensayo del cometa, o ensayo de electroforesis en microgel de células aisladas, se utiliza a menudo en estudios de biomonitorización de exposiciones ambientales, ocupacionales y dietéticas como un biomarcador de exposición a agentes genotóxicos (Azqueta *et al.*, 2019).

Se trata de un método rápido, versátil y sensible para analizar y cuantificar el daño primario en el ADN en células individualizadas. Se ha utilizado ampliamente en estudios *in vitro* e *in vivo*, empleando para ello varios sistemas celulares y biomatrices diferentes. En los estudios *in vitro* y de biomonitorización, el tipo de célula primaria humana más comúnmente utilizada son los leucocitos obtenidos a partir de muestras de sangre periférica.

A mayores, el ensayo del cometa presenta ventajas frente a otros tests ya que tiene mayor sensibilidad para detectar niveles bajos de daño en el ADN utilizando una menor cantidad de células (Collins *et al.*, 2008; Dhawan *et al.*, 2009). A nivel metodológico, este ensayo se fundamenta sobre la idea de combinar la electroforesis de ADN en gel de agarosa con el empleo de la microscopía de fluorescencia para visualizar la migración de las cadenas rotas de ADN, embebidas en la matriz del gel (Azqueta *et al.*, 2013).

En cuanto al desarrollo del ensayo del cometa, Östling y Johanson fueron considerados los precursores de la técnica ya que observaron la migración del ADN de células de mamíferos irradiadas. Tras someter a electroforesis la suspensión celular (embebida en agarosa y dispuesta en un portaobjetos) y analizarla al microscopio, los dos investigadores destacaron que, en comparación con las células control, la migración electroforética había aumentado. Originalmente, el ensayo del cometa fue desarrollado para ser llevado a cabo bajo condiciones neutras de pH, detectando dobles roturas en el ADN (Östling y Johanson, 1984). A lo largo del tiempo, el ensayo del cometa se ha ido modificando para detectar otros tipos de daño en diferentes tipos celulares (Smith *et al.*, 2006).

El protocolo estándar del ensayo cometa consiste en suspender una determinada cantidad de células sobre un gel de agarosa dispuesto sobre un portaobjetos. Esas células pueden proceder de células que ya se encontraban separadas, como por ejemplo leucocitos que circulan en sangre, o bien de un tejido a partir del cual se obtiene una suspensión celular, bien por tratamiento mecánico o enzimático (Azqueta *et al.*, 2019). La agarosa que se emplea es de bajo punto de fusión (en torno a 40°C) para evitar dañar las células. A continuación, se realiza una lisis celular con detergentes en condiciones de alta salinidad a pH neutro o alcalino. En este paso se destruye la membrana plasmática y la membrana nuclear, quedando únicamente el material genético, es decir, el nucleoide.

Una vez las células están lisadas, se dejan en contacto con la solución de electroforesis para que el ADN se pueda ir desenrollando allá donde haya roturas. Finalmente, se lleva a cabo

una electroforesis de bajo voltaje en solución neutra o alcalina. En el caso de la alcalina, es necesario realizar un paso de neutralización tras la electroforesis. Si el ADN cargado negativamente contiene roturas, los extremos migrarán durante la electroforesis en dirección hacia el ánodo. Por el contrario, en el ADN intacto, la carencia de extremos libres y el gran tamaño de los fragmentos, prevendrán su migración porque no serán capaces de atravesar los poros del gel de agarosa. Por último, es necesario teñir el material genético con un colorante fluorescente para poder observarlo en un microscopio de fluorescencia. La imagen que se genera al microscopio en el caso de células con roturas de cadena se asemeja a la de un cometa, dando nombre al ensayo, mientras que las células no dañadas permanecerán con forma esférica (Figura 3).

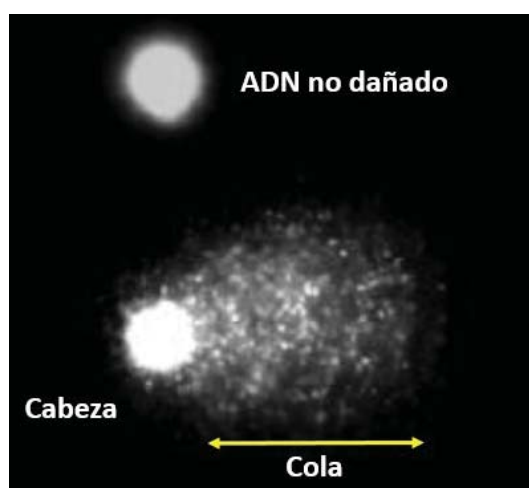


Figura 3. Ejemplo de imágenes obtenidas al microscopio de fluorescencia correspondientes a células que presentan (inferior) y no presentan (superior) daño en su ADN. Tomada y modificada de la fuente: Valenzuela-Bustamante et al. (2008).

La elección del pH está determinada por el tipo de daño genético que se quiera detectar. En medio neutro se detectan roturas de ADN de cadena sencilla y cadena doble, y también la presencia de entrecruzamientos. A pH alcalino, se detecta mayor cantidad de daño porque, aparte de todo lo anterior, provoca que tipos adicionales de lesiones genéticas, tales como la pérdida de bases nitrogenadas (lugares abásicos), deriven en roturas.

3.2.2 Daño oxidativo en el ADN

Adicionalmente, en la actualidad disponemos de metodologías alternativas o variantes del ensayo cometa, que enriquecen la información proporcionada sobre el tipo de daño detectado. Así, el empleo de enzimas de reparación para evaluar la cinética de reparación por escisión de bases y detectar tipos específicos de daños celulares, ha añadido gran valor al ensayo

del cometa, especialmente la endonucleasa III (EndoIII) (escinde pirimidinas oxidadas), la formamidopirimidina ADN glucosilasa (Fpg) (purinas oxidadas) y la 8-oxo-guanina ADN glucosilasa 1 humana (hOGG1) (escinde la 8-oxo-7,8-dihidroguanina [8-oxoGua], un excelente marcador de estrés oxidativo) (Collins *et al.*, 2014).

La hOGG1 presenta una alta especificidad por el daño oxidativo más frecuente en el ADN: la 8-oxoGua (Smith *et al.*, 2006). Este daño se produce por la oxidación de una guanina mediante la adición de un grupo hidroxilo en la posición 8. Esta enzima es capaz de reconocer y eliminar específicamente la 8-oxoGua, generando un sitio abásico o apurínico en el ADN, qué dará lugar a una rotura de cadena durante la incubación en medio alcalino en el transcurso del ensayo, generando fragmentos de ADN que pueden ser identificados y cuantificados mediante el protocolo estándar del ensayo del cometa.

En apartados anteriores, se ha descrito que la inducción de estrés oxidativo y daño oxidativo en el ADN parece ser el mecanismo principal de genotoxicidad de las NP metálicas. Por lo tanto, en este trabajo, además del protocolo estándar del ensayo cometa, se ha llevado a cabo un protocolo modificado con incubación con la enzima hOGG1 para evaluar el daño oxidativo originado por las NP.

OBJETIVOS

En un estudio reciente realizado por nuestro grupo de investigación, se demostró que los leucocitos obtenidos a partir de muestras de saliva humanas resultan una buena alternativa no invasiva a los leucocitos de sangre periférica para la evaluación de genotoxicidad utilizando el ensayo del cometa (Fernández-Bertólez *et al.*, 2021). Además, este tipo celular resulta especialmente interesante en el caso de exposiciones recientes a contaminantes presentes en el medio ambiente, particularmente aquellos que penetran en el organismo por vía inhalatoria u oral (Russo *et al.*, 2020).

En base a ello, los objetivos planteados en el presente estudio han sido los siguientes:

1. Evaluar la idoneidad de los leucocitos de saliva como biomatriz para la evaluación de la genotoxicidad de NP de óxidos metálicos mediante el ensayo del cometa.
2. Analizar la posible existencia de interferencias causadas por NP de TiO₂, ZnO y CeO₂ con la metodología del ensayo del cometa y con la actividad de la enzima hOGG1.
3. Determinar el daño primario en el ADN causado por exposición de leucocitos de saliva a un rango de concentraciones de NP de TiO₂, ZnO y CeO₂ mediante la versión estándar alcalina del ensayo del cometa.
4. Analizar la inducción de daño oxidativo en el ADN de leucocitos de saliva por su tratamiento con NP de TiO₂, ZnO y CeO₂ por medio del ensayo del cometa modificado con la enzima hOGG1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención y procesamiento de las muestras

Para realizar este estudio, se obtuvieron muestras de saliva de seis voluntarios sanos no fumadores, participando tres mujeres y tres hombres, de entre 18 y 53 años. Se indicó a los donantes que no comieran ni bebieran nada más que agua durante la hora anterior al muestreo, a fin de que ningún resto de alimento pudiera interferir en el ensayo. Cada sujeto realizó cuatro enjuagues bucales consecutivos de 1 min cada uno con 10 ml de solución estéril de NaCl al 0,9%. Los cuatro enjuagues de cada donante se combinaron en tubos de centrifuga estériles de 50 ml.

A continuación, se centrifugaron los tubos durante 15 minutos a 1500 rpm y 4°C. Se descartaron los sobrenadantes por decantación y se resuspendieron los sedimentos celulares o *pellets* en 2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Seguidamente, se preparó un *pool* combinando las suspensiones celulares de los seis donantes en un único tubo estéril. Ese *pool* se centrifugó durante 15 min a 4°C y 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 8 ml de medio celular RPMI-1640.

Los leucocitos mononucleares presentes en las muestras se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Histopaque®-1077 (Sigma–Aldrich Co.), de acuerdo con las pautas del fabricante. De forma resumida, los 8 ml de suspensión celular se vertieron lentamente sobre 4 ml de Histopaque®-1077 (proporción 2:1) con la ayuda de una pipeta Pasteur, inclinando el tubo y dejando fluir el líquido a lo largo de la pared para evitar el mezclado de las dos fases.

Después, se centrifugó en gradiente de densidad a 1400 rpm y 20°C durante 30 min, con el freno de la centrifuga desactivado (Figura 4). Finalizada la centrifugación, se descartó muy cuidadosamente la parte superior del contenido del tubo, y la interfaz conteniendo los leucocitos mononucleares se transfirió a otro tubo estéril con 5 ml de PBS. Luego, se centrifugó el *pool* de leucocitos durante 15 min a 1500 rpm y 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento celular con 10 ml de PBS. Nuevamente, se centrifugó utilizando los mismos parámetros.

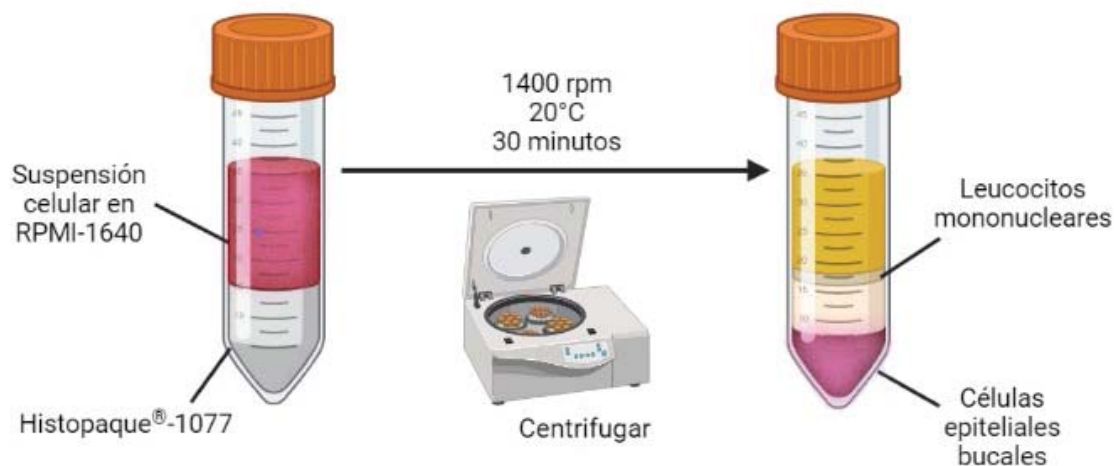


Figura 4. Dibujo representativo del aislamiento de los leucocitos mononucleares por gradiente de densidad con Histopaque®-1077.

Una vez retirado el sobrenadante, las células se resuspendieron en medio de congelación [40% de medio RPMI 1640, 50% de suero bovino fetal (FBS) y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO), que actúa como criopreservante], a una concentración final de $2,5 \times 10^6$ células/ml, y se almacenaron en viales criogénicos a -80°C hasta su uso (al menos una semana más tarde).

2. Suspensiones de las nanopartículas: preparación y caracterización

Las NP utilizadas en este estudio han sido las siguientes: NP de TiO_2 (rutilo:anatasa 15:85) (N° CAS 13463-67-7), obtenidas de Degussa-Evonik, y NP de ZnO (N° CAS 1314-13-2) y NP de CeO_2 (N° CAS 1306-38-3), obtenidas ambas de Sigma-Aldrich Co.

Antes de realizar los experimentos de genotoxicidad, fue necesario determinar las características físico-químicas de las NP para describir correctamente su toxicidad. Con ese fin, las NP se suspendieron tanto en agua desionizada como en medio de cultivo de los leucocitos [medio RPMI 1640 que contenía FBS al 15%, L-glutamina (200 mM) al 1% y penicilina (5000 U/ml) / estreptomicina (5000 $\mu\text{g/ml}$) al 1% (todos de Gibco)] a concentraciones finales de 150, 40 y 10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (las mayores concentraciones a utilizar en la evaluación de la genotoxicidad).

Para evitar la aglomeración de las NP y obtener una buena dispersión, las suspensiones fueron sometidas a ultrasonificación con una sonda de 2,5 mm (Sonoplus mini 20, Bandelin) a una potencia de 30 W durante 5 min (0,5 min encendido y 1 min apagado, dos veces, más 2 min adicionales encendido). Para evitar el calentamiento de las suspensiones de NP durante la sonicación, los tubos se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. Se realizaron tres réplicas independientes de cada suspensión.

La dispersión dinámica de luz (DLS) y las mediciones del potencial zeta se realizaron en un Zetasizer Nano-ZS (modelo ZEN 3600, Malvern Instruments Ltd.), equipado con un láser de He-Ne de 4.0 mW y 633 nm. Se utilizaron la DLS y la velocimetría láser Doppler (LDV) para caracterizar el diámetro hidrodinámico y la carga (potencial zeta) de las NP, respectivamente. Los resultados de caracterización fueron proporcionados por el Departamento de Saúde Ambiental del Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge de Oporto (Portugal), con el que colaboramos con asiduidad.

Adicionalmente, una vez obtenidas, dispersadas y caracterizadas las suspensiones de las NP en el medio de cultivo a la concentración más alta a analizar, se prepararon las diluciones de trabajo requeridas para los tratamientos: 80, 120 y 150 $\mu\text{g/ml}$ de NP de TiO_2 , 20, 30 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de NP de ZnO , y 0,5, 2 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de NP de CeO_2 .

3. Tratamientos

Los leucocitos de saliva congelados se descongelaron en baño a 37°C . Posteriormente, el *pool* de leucocitos se añadió a un tubo que contenía PBS para realizar un lavado. Se centrifugó a 1500 rpm y 20°C durante 15 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular nuevamente con PBS.

A continuación, se llevó a cabo el reparto de los leucocitos en tubos eppendorf conteniendo $6,6 \times 10^4$ células/ml, en donde se aplicaron los distintos tratamientos en un volumen final de 1 ml. Los tratamientos con NP se mantuvieron durante 3 h a 37°C en un incubador con atmósfera humidificada y 5% de CO_2 .

En cada experimento se incluyeron un control negativo (medio de cultivo) y un control positivo, que fue metilmetano sulfonato (MMS, N° CAS 66-27-3, Sigma Aldrich Co.) 50 $\mu\text{g/ml}$ durante 3 h en el caso de la evaluación de daño primario en el ADN, y bromato potásico (KBrO_3 , N° CAS 7758-01-2, Sigma Aldrich Co.) 335 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 h en el caso del daño oxidativo.

Las dosis y el tiempo de tratamiento se seleccionaron en función de los resultados obtenidos en otros estudios previos como Hussain *et al.*, (2012); Valdiglesias *et al.* (2013a) y Valdiglesias *et al.* (2013b).

4. Evaluación de la viabilidad celular

Tras los tratamientos y antes de llevar a cabo el ensayo del cometa, se utilizó la técnica de exclusión de azul de tripano para evaluar la viabilidad celular. Para ello, las células se centrifugaron a 1500 rpm 5 min, se resuspendieron en PBS, y se mezclaron 20 µl de la suspensión celular con 20 µl de solución de azul de tripano al 0.4% (N° CAS 72-57-1, Sigma Aldrich Co.). El número de células positivas, teñidas con el colorante y por tanto no viables, se midió en una cámara de Neubauer usando un microscopio de contraste de fases (Nikon HFX-DX) (Figura 5). La viabilidad celular se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Viabilidad} = 100 - [(\text{n}^\circ \text{ de células muertas} / \text{número total de células contadas}) \times 100]$$

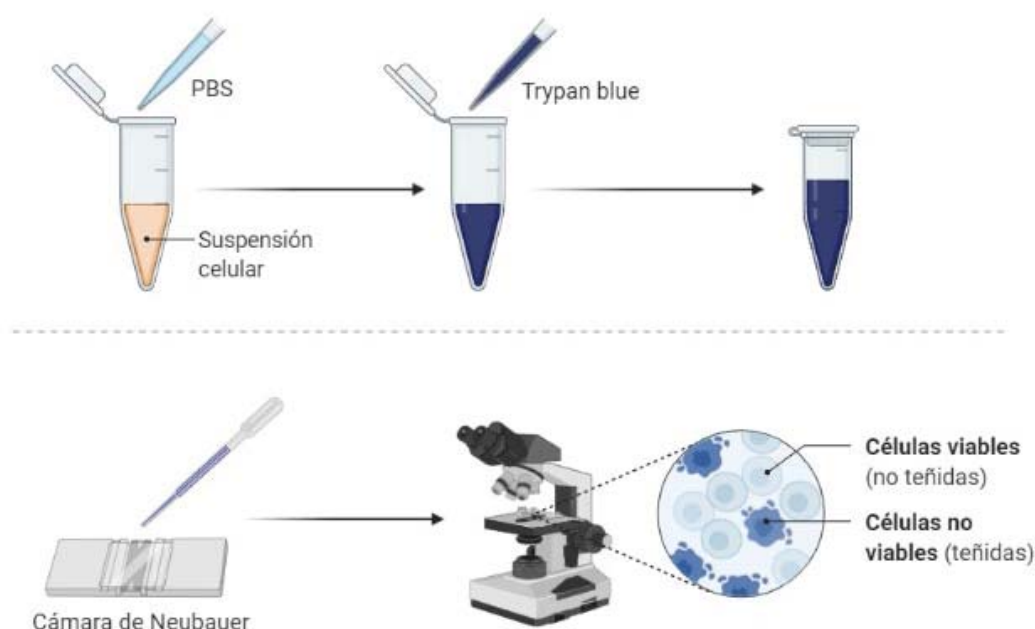


Figura 5. Esquema del proceso de estimación de la viabilidad de los leucocitos mediante la exclusión del azul de tripano.

5. Ensayo cometa alcalino

En el presente trabajo, el ensayo cometa se describe teniendo en cuenta las recomendaciones de la “Información mínima para describir los procedimientos y resultados del ensayo del cometa” (MIRCA, por sus siglas en inglés) (Møller *et al.*, 2020). El daño primario en el ADN (roturas de cadena simple y doble, sitios abásicos, sitios sensibles al álcali y sitios de reparación por escisión incompleta) inducido en los leucocitos salivales por la exposición a NP, se evaluó mediante el ensayo cometa en su versión estándar a pH alcalino.

Tras los tratamientos, las células se centrifugaron a 9000 rpm durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron 20 µl de la suspensión celular remanente en 80 µl de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0,9% recién preparada (concentración de agarosa final 0,72%). Se colocaron dos gotas de esta suspensión de 40 µl cada una sobre un portaobjetos previamente recubierto con una capa de agarosa de punto de fusión normal al 1% en H₂O destilada estéril. Tras depositar las gotas de la suspensión, éstas se cubrieron con cubreobjetos de 20x20 mm. Por último, se dejó solidificar la agarosa, colocando los portaobjetos en hielo durante 15 min.

Trascurrido ese tiempo, se quitaron los cubreobjetos y se sumergieron los portaobjetos en solución de lisis (NaOH 250 mM, Tris-HCl 10 mM, Na₂EDTA 100 mM, NaCl 2.5 M, pH 10, y Triton X-100 al 1% agregado justo antes de su uso), permaneciendo durante toda la noche a 4°C y en condiciones de oscuridad para evitar daño adicional sobre el ADN debido a la exposición a la luz al trabajar con compuestos fotoactivadores como el TiO₂ (Gerloff *et al.*, 2009). Tras lisar las células, los portaobjetos se colocaron en una cubeta de electroforesis horizontal colocada sobre un baño de hielo, y se incubaron en la oscuridad durante 20 min en una solución alcalina de electroforesis recién preparada (NaOH 300 mM, Na₂EDTA 1 mM, pH >13) para facilitar el desenrollamiento del ADN y la expresión de sitios sensibles al medio alcalino. A continuación, se llevó a cabo la electroforesis durante 20 min a 300 mA y 30 V (0,83 V/cm).

Una vez finalizada la electroforesis, se llevaron a cabo 3 lavados de 5 min cada uno con una solución neutralizante (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5). Los portaobjetos se colocaron sobre un papel de filtro y se dejaron secar al aire durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, las preparaciones se codificaron para realizar la evaluación a “ciegas” y se tiñeron con 25 µl de colorante fluorescente 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 5 µg/ml por gota. Los portaobjetos se almacenaron a 4°C en una caja húmeda sellada para evitar el secado del gel de agarosa, y fueron analizados dentro de los seis días siguientes. A continuación, se presenta un esquema de todo el proceso llevado a cabo (Figura 6).

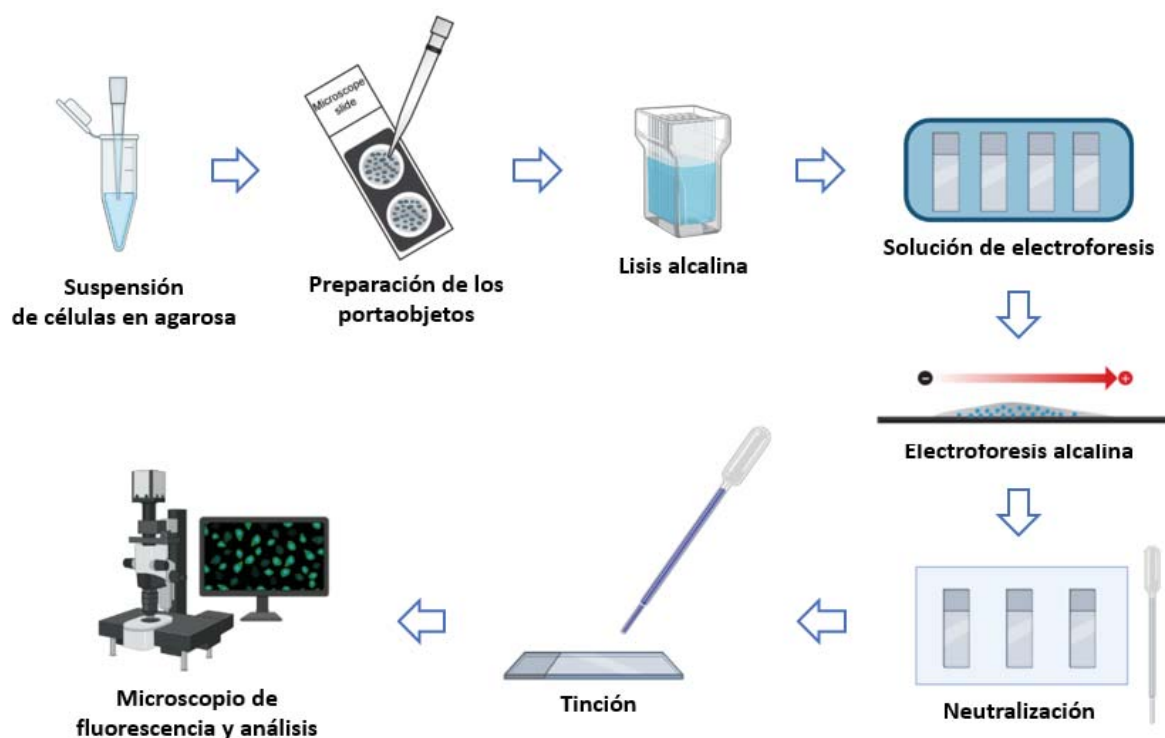


Figura 6. Esquema de la metodología realizada para el ensayo del cometa estándar.

Se utilizó el programa Comet IV (Perceptive Instruments) para la captura y análisis de las imágenes. Se analizaron un total de 100 nucleoides por cada portaobjetos, cincuenta por gota/réplica, utilizando un aumento de 40x. El porcentaje de ADN en la cola del cometa (%tDNA) se empleó como parámetro estimador del daño en el ADN.

Además, antes de realizar los experimentos del ensayo del cometa, se comprobó si las NP interferían con el protocolo estándar del ensayo, siguiendo las directrices descritas por Magdolenova *et al.* (2012). Para ello, después de descongelar los leucocitos, se centrifugaron a 9000 rpm durante 3 min y se eliminó el sobrenadante. Se mezclaron 20 µl del sedimento celular con 40 µl de agarosa LMP al 1,8% y 40 µl de cada NP, de tal forma que su concentración final fuese la concentración más elevada testada en este estudio (150, 40 y 10 µg/ml para las NP de TiO₂, ZnO y CeO₂, respectivamente). La mezcla se distribuyó en dos gotas de 40 µl cada una sobre los portaobjetos. A continuación, se realizó el ensayo cometa alcalino, de acuerdo con el protocolo general descrito anteriormente. Los resultados obtenidos para cada tipo de NP se compararon con un control negativo (leucocitos sin NP).

6. Ensayo cometa modificado con hOGG1

Para evaluar el daño oxidativo en el ADN inducido por las NP, se llevó a cabo el ensayo del cometa modificado con la enzima hOGG1 al finalizar los tratamientos. Se prepararon

portaobjetos duplicados para cada condición experimental, colocando dos gotas de la suspensión celular en agarosa por portaobjetos.

Después de seguir el protocolo del ensayo cometa alcalino estándar hasta la finalización de la etapa de lisis, los portaobjetos se lavaron con el tampón de la enzima (KCl 0,1 M, EDTA 0,5 mM, Hepes 40 mM, 0,2 mg/ml de albúmina de suero bovino, pH 8,0) tres veces durante 5 min cada vez en oscuridad. En condiciones de luz reducida, uno de los portaobjetos de cada condición se trató con 50 μ l de hOGG1 (0,0016 U/ μ l de tampón) (Trevigen, Inc.) y el otro portaobjetos se trató con solo 50 μ l de tampón. Seguidamente, se colocaron cubreobjetos encima de cada gota y se incubaron los portaobjetos a 37°C durante 10 min en una caja húmeda. A continuación, los portaobjetos se procesaron como en el ensayo cometa alcalino estándar descrito anteriormente. Los sitios netos sensibles a hOGG1 (daño oxidativo en el ADN) se calcularon para cada condición experimental restando el %tDNA correspondiente a los portaobjetos que se incubaron solo con el tampón al correspondiente a los portaobjetos que se incubaron con la enzima.

Al igual que con el ensayo cometa estándar, antes de realizar los experimentos del ensayo cometa modificado con hOGG1, se examinó la posible existencia de interferencias de las NP con la actividad de la enzima hOGG1, de acuerdo con las indicaciones de Magdolenova et al., (2012). Para ello, los leucocitos se incubaron durante 1 h conjuntamente con KBrO₃ 335 μ g/ml y la concentración más alta de cada NP probada (150, 40 y 10 μ g/ml para las NP de TiO₂, ZnO y CeO₂, respectivamente), y también solo con KBrO₃ 335 μ g/ml. Seguidamente, se realizó el ensayo cometa modificado con hOGG1 como se describió anteriormente. Los resultados obtenidos para cada tipo de NP en combinación con KBrO₃ y para KBrO₃ se compararon con un control negativo (células sin tratamiento).

7. Análisis estadístico

En primer lugar, se llevaron a cabo tres experimentos independientes para cada condición experimental probada, y cada condición se ejecutó siempre por duplicado. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows V.21. Los datos experimentales se expresaron como media \pm error estándar. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para analizar las diferencias entre los grupos (todas las concentraciones testadas bajo las mismas condiciones), y la prueba *U* de Mann-Whitney para realizar comparaciones dos a dos. Las relaciones concentración-respuesta se evaluaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman. El umbral de significación se fijó en 0,05.

RESULTADOS

En este trabajo se han testado leucocitos humanos de muestras de saliva como modelo *in vitro* para la evaluación de la genotoxicidad de nanomateriales. Estas células se trataron con tres NP de óxidos metálicos diferentes, y se estudió la inducción de daño primario y oxidativo en el ADN mediante metodologías basadas en el ensayo del cometa. Previamente a llevar a cabo esta evaluación, se analizó la posible interferencia de las NP con la metodología del ensayo del cometa y con la actividad enzimática de la hOGG1.

1. Caracterización de las nanopartículas

En la Tabla 1, se pueden contemplar las principales propiedades físico-químicas de las NP utilizadas en este trabajo, concretamente el tamaño, el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta. Para ello, las NP fueron suspendidas tanto en agua desionizada como en el medio de cultivo de leucocitos.

Tabla 1. Valores obtenidos en la caracterización de las nanopartículas utilizadas en este estudio

NP	Tamaño partícula ^a (nm)	Diámetro hidrodinámico (nm) ^b (DLS)		Potencial zeta (mV) ^b (LDV)	
		Agua	Medio	Agua	Medio
TiO ₂	25 (TEM)	199,1 ± 2,6	264,7 ± 28,2	22,8 ± 3,5	-10,6 ± 0,4
ZnO	100 (BET)	485,6 ± 26,3	199,1 ± 37,8	14,4 ± 1,7	-10,7 ± 0,7
CeO ₂	18 (BET)	175,3 ± 10,2	197,9 ± 69,4	9,9 ± 2,5	-10,4 ± 0,9

BET: Brunauer-Emmett-Teller; DLS: dispersión dinámica de la luz; LDV: velocimetría laser Doppler; TEM: microscopía electrónica de transmisión.

^aProporcionado por el proveedor comercial. ^bMedia ± error estándar.

Por una parte, se observaron valores ligeramente más altos de las medias del diámetro hidrodinámico en medio de cultivo que en suspensiones acuosas para las NP de TiO₂ y CeO₂. Sin embargo, el valor obtenido para las NP de ZnO en medio fue notablemente menor que en agua. Por otro lado, los valores del potencial zeta fueron negativos y menores (en valor absoluto) en medio que en agua, a excepción de las NP de CeO₂, que mostraron un valor positivo levemente menor en agua.

2. Evaluación de la viabilidad celular

Tras los tratamientos con las NP se evaluó la viabilidad celular para evitar resultados falsos positivos en la evaluación de la genotoxicidad debido a la presencia de excesiva citotoxicidad (se recomienda inferior a un 30%) (Tice *et al.*, 2000). Como se muestra en la Figura 7, los valores obtenidos para las concentraciones más altas de las NP analizadas fueron siempre superiores al 80%.

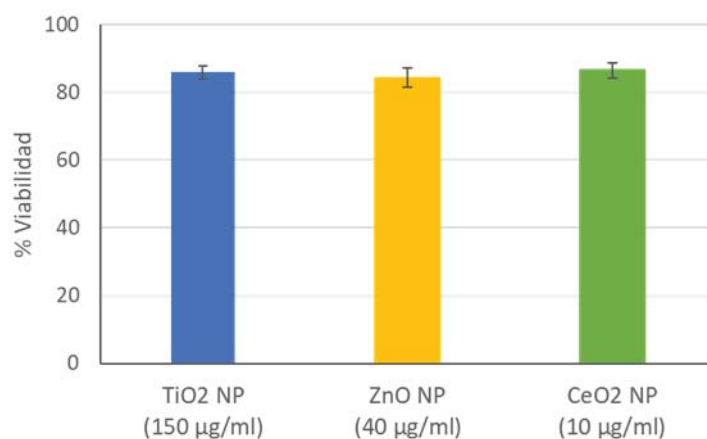


Figura 7. Resultados de la evaluación de la viabilidad celular. Las barras representan el error estándar de la media.

3. Evaluación del daño primario: Ensayo cometa alcalino

Antes de realizar los experimentos del ensayo del cometa estándar alcalino, se evaluaron las posibles interferencias de las NP con esta metodología. En este punto, se analizaron las alteraciones provocadas en la migración del ADN durante la electroforesis, bien por la inducción directa de roturas en el ADN desnudo o bien por la inhibición de la migración del ADN. Los resultados obtenidos para la evaluación de las interferencias se recogen en la Figura 8. No se encontraron diferencias significativas en las roturas del ADN entre las células en presencia de las diferentes NP (añadidas a la agarosa justo antes de preparar los microgeles) y las células en ausencia de NP. Estos resultados indican que, la presencia de cada tipo de NP no interfirió en ningún momento con el desarrollo normal del protocolo del ensayo y la detección del daño primario en el ADN.

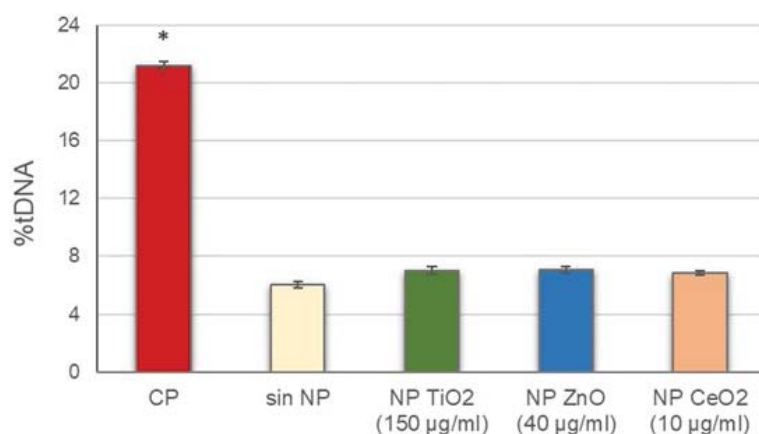


Figura 8. Resultados de la evaluación de la interferencia de las NP con la metodología de ensayo del cometa. Las barras representan el error estándar de la media. CP: control positivo (50 µg/ml de MMS durante 3 h). * $P < 0,01$, diferencia significativa con respecto a sin NP.

Posteriormente, los leucocitos se expusieron a las tres NP de óxidos metálicos y se llevó a cabo el ensayo cometa alcalino para determinar el daño primario inducido. Los resultados obtenidos de esta etapa se muestran en la Figura 9.

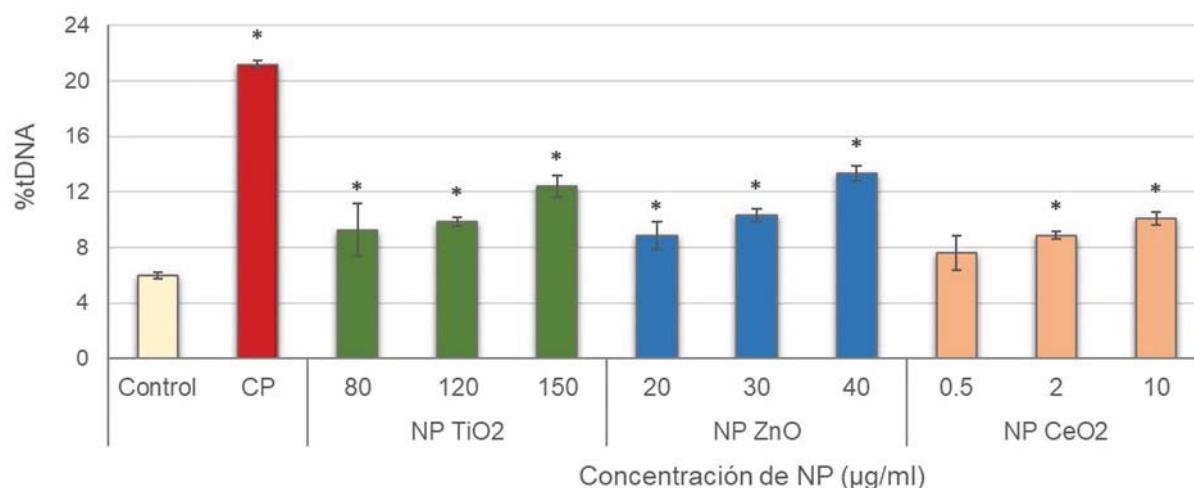


Figura 9. Resultados del daño primario en el ADN inducido en los leucocitos salivales por la exposición a NP de TiO₂, ZnO y CeO₂. Las barras representan el error estándar de la media. CP: control positivo (50 µg/ml de MMS durante 3 h). * $P < 0,01$, diferencia significativa con respecto al control negativo (daño basal).

Se obtuvieron aumentos significativos en el daño del ADN con respecto al control negativo en todos los tratamientos probados (distintas concentraciones de NP), con tendencias crecientes dependientes de la concentración y significativas para todas las NP, de acuerdo con

los siguientes coeficientes de correlación: $r = 0,953$; $*P < 0,01$ para las NP de TiO_2 ; $r = 0,969$; $*P < 0,01$ para las NP de ZnO , y $r = 0,926$; $*P < 0,01$ para las NP de CeO_2 .

4. Evaluación del daño oxidativo: Ensayo cometa modificado con hOGG1

Antes de abordar la inducción del daño oxidativo en el ADN por parte de las NP, se evaluaron las posibles interferencias de estas NP con la actividad de la enzima hOGG1. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 10.

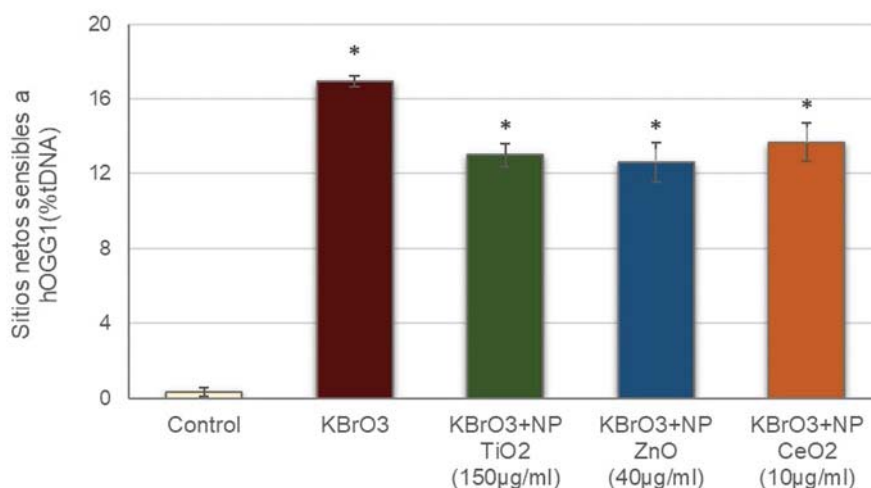


Figura 10. Resultados correspondientes a la evaluación de la interferencia de las NP con la actividad de la enzima hOGG1. Las barras representan el error estándar de la media. $*P < 0.01$, diferencia significativa con respecto al control.

Los sitios netos sensibles a hOGG1 observados en las células tratadas con KBrO_3 en presencia de las diferentes NP, aumentaron significativamente con respecto al control negativo. De igual manera ocurrió con las células tratadas solo con KBrO_3 . Estos datos demuestran que la enzima hOGG1 en presencia de estas NP todavía es capaz de detectar el daño oxidativo en el ADN inducido por KBrO_3 . Por lo tanto, estos resultados verifican que la presencia de NP no interfirió en la capacidad de hOGG1 para detectar eficazmente las bases de ADN oxidadas.

Los resultados correspondientes a la evaluación del daño oxidativo en el ADN inducido por las tres NP de óxidos metálicos testadas, se representan en la Figura 11.

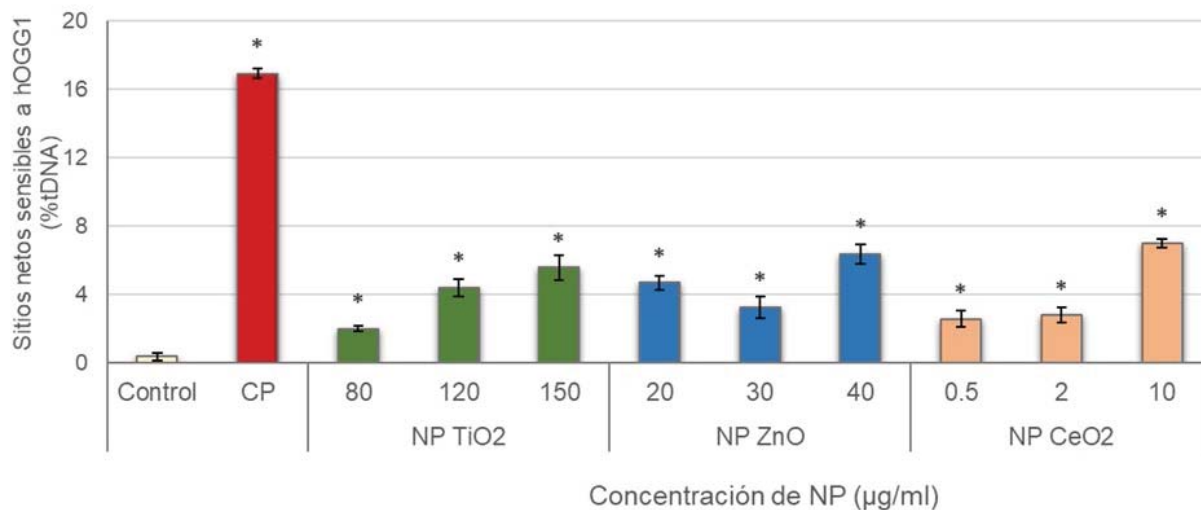


Figura 11. Resultados correspondientes al daño oxidativo en el ADN inducido en los leucocitos salivales por la exposición a NP de TiO_2 , ZnO y CeO_2 . Las barras representan el error estándar de la media. CP: control positivo (335 µg/ml de KBrO_3 durante 1 h). * $P < 0.01$, diferencia significativa con respecto al control.

Todos los tratamientos probados, mostraron valores de sitios netos sensibles a hOGG1 significativamente incrementados con respecto al control negativo. Asimismo, se observaron relaciones dosis-respuesta significativas: $r = 0,921$; * $P < 0,01$ para las NP de TiO_2 ; $r = 0,738$; * $P < 0,01$ para las NP de ZnO , y $r = 0,883$; * $P < 0,01$ para las NP de CeO_2 .

DISCUSIÓN

Al igual que con todas las tecnologías de nueva era, los beneficios que proporciona la nanotecnología deben sopesarse frente a los posibles riesgos para la salud y el medio ambiente asociados con su desarrollo, utilización y desecho. Los nanomateriales manufacturados se encuentran en un número exponencialmente creciente de productos de consumo (Vance *et al.*, 2015), en los que pueden mejorar su dureza, reactividad y durabilidad, o proporcionar otras características enteramente nuevas. Sin embargo, el desarrollo de metodologías para la evaluación de la seguridad de los nanomateriales y la determinación de los posibles riesgos asociados a su uso no ha tenido lugar al mismo ritmo que su rápida comercialización (Johnston *et al.*, 2020). Esto motiva que, lamentablemente, los datos disponibles sobre la exposición humana y ambiental a los nanomateriales y su toxicidad sean en la actualidad limitados y no permitan realizar evaluaciones de riesgo cuantitativas sobre los nanomateriales de nueva síntesis. Así, estos contaminantes antropogénicos emergentes se han convertido en un asunto de gran preocupación para la salud pública.

Además, el problema se agrava aún más dada la cuestionable idoneidad de los test de toxicidad clásicos disponibles (Golbamaki *et al.*, 2015). A este respecto, en los últimos años se han realizado trabajos centrados en el uso del análisis causa-efecto para describir sistemáticamente fuentes clave de variabilidad para los nanobioensayos *in vitro*, incluyendo al ensayo del cometa, a fin de apoyar la estandarización de las metodologías (Petersen *et al.*, 2020). Así, se han identificado para este ensayo una variedad de sesgos o artefactos potenciales cuando se utiliza para el testado de nanomateriales. En consecuencia, se ha recomendado la realización de medidas de control para evaluar la extensión de la posible interferencia de los nanomateriales con el protocolo del ensayo, entre las cuales se incluyen las llevadas a cabo en el presente estudio.

Las tres NP de óxidos metálicos que se evaluaron en este estudio son nanomateriales muy relevantes, ya que son producidas a gran escala y su uso está generalizado en varios productos de consumo disponibles en el mercado (Xia *et al.*, 2014). Estas NP se encuentran entre los nanomateriales más utilizados debido a su aplicación en muy distintas áreas. Abordan campos como por ejemplo la industria alimentaria (Berekaa, 2015; Shafiq, 2020), la cosmética (Bilal *et al.*, 2020; Dréno *et al.*, 2019), la industria textil (Costa *et al.*, 2021; Mishra *et al.*, 2014), el sector biomédico (Baetke *et al.*, 2015; Pelaz *et al.*, 2017), etc. A medida que pasan los años, cada vez hay más productos manufacturados que contienen NP. La creciente producción y uso

de NP por sus propiedades únicas gracias a su naturaleza nanométrica, da como resultado una mayor exposición de los seres humanos y del medio ambiente (Sengul *et al.*, 2020).

A causa de su uso generalizado, se liberan al medio grandes cantidades de estas tres NP. Además, hay que tener en cuenta su consumo en productos de uso cotidiano. Sus efectos sobre la salud no están completamente identificados, por lo que, no se puede descartar ningún riesgo potencial asociado a su exposición. Como se ha mencionado en la Introducción, se considera la vía inhalatoria como vía principal de entrada al organismo para estas NP, de modo que los leucocitos salivales parecen ser una biomatriz adecuada para la evaluación de los efectos genotóxicos de exposiciones ambientales u ocupacionales a estas NP. Adicionalmente, son muestras fáciles de obtener y de bajo coste, y pueden recolectarse de forma no invasiva sin necesidad de intervención de personal sanitario capacitado, ya que puede realizarlo el propio individuo. A pesar de presentar estas ventajas, hasta la fecha estas células no han sido utilizadas para evaluar la nanotoxicidad *in vitro*.

En un estudio recientemente publicado por nuestro grupo de investigación, se demostró que los leucocitos de saliva resultan una biomatriz adecuada para la evaluación de genotoxicidad mediante el ensayo del cometa, y que además la criopreservación de estas células no tiene efectos sobre su sensibilidad ante la inducción de diferentes tipos de daño genotóxico (Fernández-Bertólez *et al.*, 2021). Es por ello, y motivado además por la mayor flexibilidad metodológica que ofrece el trabajar con muestras congeladas, que en el presente estudio se decidió utilizar linfocitos salivales criopreservados como modelo celular *in vitro*.

Para evaluar los efectos tóxicos que pueden generar estos nanomateriales en el ser humano y en el medio ambiente, es importante realizar una caracterización detallada de cada una de las NP, ya que sus propiedades físico-químicas influyen en su comportamiento (Warheit 2008). Debido a su demostrada influencia en el comportamiento biológico de los nanomateriales, al menos deben incluirse en dichas propiedades: el tamaño de la partícula, su composición química, su química superficial y su carga (Hansen *et al.*, 2007; Stone *et al.*, 2010). Si no se describe de manera completa el tipo de NP que se va a evaluar, los resultados de los experimentos de nanotoxicidad que se obtendrán tendrán un valor limitado. Básicamente, las propiedades de los nanomateriales influyen en la biodisponibilidad, el transporte, el destino, la absorción celular y la catálisis de las respuestas biológicas nocivas (Zhu *et al.*, 2013).

Por otra parte, las partículas de diámetro más pequeño muestran una tendencia creciente a la aglomeración, debido a las fuerzas electrostáticas y de Van der Waals. Por lo tanto, obtener una dispersión uniforme de estas partículas es esencial para obtener las propiedades deseadas y llevar a cabo los estudios de toxicidad (Coetzee *et al.*, 2020).

En la caracterización físico-química de las NP de este estudio, se observó que las partículas nanométricas se dispersaron con éxito en el medio de cultivo de leucocitos. El diámetro hidrodinámico de las NP de TiO₂ y CeO₂ aumentó ligeramente cuando las NP se dispersaron en el medio, probablemente debido a la formación de una corona proteica. Por el contrario, el tamaño hidrodinámico de la NP de ZnO resultó considerablemente mayor en agua, lo que sugiere una mayor tendencia a la aglomeración en este fluido que en el medio de cultivo celular. Los análisis del potencial zeta por LDV mostraron valores más negativos para las tres NP dispersas en medio que en agua desionizada, concordando con los resultados obtenidos en estudios previos para NP de CeO₂ (Kumari *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2016), ZnO (Valdiglesias *et al.*, 2013a) y TiO₂ (Taurozzi *et al.*, 2013), y sugiriendo que, tras la dispersión en el medio, las proteínas del suero son parcialmente adsorbidas sobre la superficie de las NP.

En los últimos años se ha demostrado que las pruebas toxicológicas más frecuentemente utilizadas para evaluar la potencial nocividad de diferentes agentes químicos pueden no resultar completamente adecuadas para su aplicación a la evaluación de nanomateriales (Guadagnini *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2016). Así, las características fisicoquímicas únicas de estos materiales pueden ser las responsables de interacciones inesperadas con ciertos reactivos o con los sistemas de detección de las pruebas de toxicidad estándar. En el caso particular del ensayo del cometa, se ha descrito la existencia de un mecanismo de interferencia de los nanomateriales con el protocolo alcalino, mediante su asociación con el nucleóide, lo que puede inducir roturas en el ADN desnudo o afectar a su comportamiento durante la electroforesis (Magdolenova *et al.*, 2012; Karlsson 2010). En consecuencia, durante el paso de lisis del ensayo, los nanomateriales pueden interactuar con el ADN desprotegido y causar daño adicional en esta macromolécula, interfiriendo con la sensibilidad del ensayo y, por lo tanto, falseando los resultados. Sin embargo, todavía no existe un protocolo validado para la aplicación del ensayo del cometa a la evaluación nanogenotoxicológica. De forma similar, en el protocolo modificado, las NP pueden interactuar con las enzimas de reparación del ADN, alterando su capacidad para generar roturas en las bases oxidadas, y por tanto las medidas del daño oxidativo en el ADN de las células expuestas a NP.

Por estas razones, antes de evaluar la posible nanogenotoxicidad de las NP empleadas en este estudio, se verificaron sus posibles interferencias con los procedimientos del ensayo del cometa (tanto estándar como modificado con hOGG1). Los resultados obtenidos de estos análisis no mostraron ninguna interferencia de las NP de TiO₂, ZnO y CeO₂ con el ensayo cometa alcalino estándar, descartando cualquier alteración con la migración del ADN durante la electroforesis, ya sea induciendo roturas adicionales en el ADN desnudo, o inhibiendo su migración. De forma similar, no se observó interferencia de ninguna NP con la capacidad de la enzima hOGG1 para detectar eficazmente el daño oxidativo en el ADN. Los datos existentes sobre las posibles interacciones de NP con el ensayo cometa son muy limitados. Magdolenova *et al.*, (2012) llevaron a cabo un estudio en el que se comprobaron las posibles interferencias de cinco NP diferentes con el ensayo del cometa estándar: NP de Fe₃O₄ (recubiertas de ácido oleico y desnudas), de ácido poliláctico-co-glicólico, de TiO₂ y de SiO₂. En los resultados se encontró que solo las NP de Fe₃O₄ recubiertas con ácido oleico inducían un marcado nivel de daño en el ADN, demostrando la inducción de interferencias. Por ende, los resultados obtenidos respecto a las NP de TiO₂ concuerdan con los observados en el presente estudio, ya que no se encontraron interferencias con el ensayo. Respecto a la enzima hOGG1, únicamente un estudio previo de nuestro grupo de investigación abordó la posible interferencia entre NP y esta enzima, encontrando interferencia únicamente a la mayor concentración testada de NP de óxido de hierro (Fe₃O₄) recubiertas de ácido oleico (200 µg/ml) en células neuronales humanas SH-SY5Y tratadas en medio de cultivo libre de suero (en ausencia de proteínas) (Fernández-Bertólez *et al.*, 2018).

Una vez descartadas las interferencias, se llevó a cabo el protocolo del ensayo cometa estándar para evaluar el posible daño primario en el ADN inducido por las NP en los leucocitos salivales. En los tres casos se encontraron aumentos significativos y dependientes de la dosis en el daño genético. Para nuestro conocimiento, éste es el primer estudio que utiliza leucocitos procedentes de muestras de saliva humana como modelo celular *in vitro* para la evaluación de nanogenotoxicidad. Sin embargo, existen varios estudios previos en la literatura que emplean el ensayo cometa alcalino estándar en diferentes tipos celulares, y describen efectos genotóxicos similares a los encontrados en este trabajo. Esto corrobora la idoneidad de los leucocitos salivales en la evaluación de la genotoxicidad de los nanomateriales. Algunos ejemplos incluyen células BEAS-2B (Falck *et al.*, 2009), A549 (Jugan *et al.*, 2012), SH-SY5Y (Valdiglesias *et al.*, 2013) o linfocitos humanos tratados con NP de TiO₂ (Ghosh *et al.*, 2013), y células HEK293 (Demir *et al.*, 2014), NIH/3T3 (Demir *et al.*, 2014), A375 (Alarifi *et al.*,

2013) y SH-SY5Y (Valdiglesias *et al.*, 2013a) expuestas a NP de ZnO. En el caso de las NP de CeO₂, la literatura científica muestra cierta controversia sobre su potencial genotoxicidad. Estudios previos mostraron de forma general que se requieren dosis superiores a las empleadas en el presente estudio (e.g. 40, 80, o incluso 200 µg/ml, según el tipo celular del que se trate) para observar efectos genotóxicos evaluados mediante el ensayo del cometa en líneas celulares expuestas a estas NP (Kumari *et al.*, 2014; Kain *et al.*, 2012; De Marzi *et al.*, 2013). No obstante, de forma similar a los presentes resultados, Auffan *et al.* y Könen-Adigüzel y Ergene obtuvieron aumentos en el daño en el ADN dependientes de la dosis a concentraciones muy bajas de NP de CeO₂ empleando fibroblastos dérmicos humanos y leucocitos de sangre periférica, respectivamente, tratados *in vitro*.

Con respecto al daño oxidativo en el ADN, las respuestas positivas observadas en los experimentos para las tres NP analizadas concuerdan con los resultados de algunos estudios previos que emplearon el ensayo del cometa modificado con FPG o hOGG1 para evaluar NP de TiO₂ (Yamani *et al.*, 2017; Di Bucchianico *et al.*, 2017), de ZnO (Valdiglesias *et al.*, 2013a) y de CeO₂ (Yamani *et al.*, 2017). Por el contrario, otros estudios no encontraron daño primario en el ADN (Pierscionek *et al.*, 2010) o daño oxidativo en el ADN (Dorier *et al.*, 2019) después de la exposición a estas NP. Esto podría deberse o a las diferentes condiciones de exposición o a la sensibilidad del tipo celular ensayado (Brandão *et al.*, 2020; Barabadi *et al.*, 2019). Estos parámetros son muy relevantes en el perfil de genotoxicidad de los nanomateriales, por lo que se deben de tener muy en cuenta a la hora de comparar resultados entre estudios. Pero también, como se ha indicado previamente, la mayoría de estos estudios no descartaron posibles interferencias entre las NP testadas y los procedimientos del ensayo del cometa. De acuerdo con los datos obtenidos en este estudio, los leucocitos salivales responden incluso a concentraciones bajas de NP de CeO₂, lo que los convierte en una herramienta valiosa para evaluaciones de exposiciones bajas, consistentes probablemente con escenarios reales de exposición humana, tanto ambiental como ocupacional.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, en este trabajo se han extraído las siguientes conclusiones:

1. Los leucocitos aislados de muestras de saliva han demostrado ser una biomatriz adecuada y sensible para realizar la evaluación de la genotoxicidad asociada a la exposición a NP de óxidos metálicos.
2. Ninguna de las NP evaluadas mostró interferencia con la metodología del ensayo del cometa o con la actividad enzimática de la hOGG1.
3. Las NP de TiO_2 , ZnO y CeO_2 indujeron aumentos en el daño en el ADN significativos y dependientes de la concentración con respecto al control negativo.
4. Las NP de TiO_2 , ZnO y CeO_2 causaron asimismo incrementos significativos del daño oxidativo en el ADN dependientes de la concentración.

BIBLIOGRAFÍA

- Akçan, R.; Aydoğan, H. C.; Yildirim, M. Ş.; Taştekin, B.; Sağlam, N. Nanotoxicity: a challenge for future medicine. *Turk. J. Med. Sci.* **2020**, 50, 1180–1196.
- Alarifı, S.; Ali, D.; Alkahtani, S.; Verma, A.; Ahamed, M.; Ahmed, M.; Alhadlaq, H. A. Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. *Int. J. Nanom.* **2013**, 8, 983–993.
- Atluri, R.; Jensen, K. A. Engineered nanomaterials: their physicochemical characteristics and how to measure them. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, 947, 3–23.
- Auffan, M.; Rose, J.; Orsiere, T.; De Meo, M.; Thill, A.; Zeyons, O.; Proux, O.; Masion, A.; Chaurand, P.; Spalla, O.; Botta, A.; Wiesner, M. R.; Bottero, J. Y. CeO₂ nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblasts in vitro. *Nanotoxicology* **2009**, 3, 161–171.
- Azqueta, A. & Collins, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol.* **2013**, 87, 949–968.
- Azqueta, A.; Ladeira, C.; Giovannelli, L.; Boutet-Robinet, E.; Bonassi, S.; Neri, M.; Møller, P. Application of the comet assay in human biomonitoring: an hCOMET perspective. *Mutat. Res-Rev. Mutat.* **2019**, 108288.
- Baetke, S.C.; Lammers, T.; Kiessling, F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *Brit. J. Radiol.* **2015**, 88, 20150207.
- Barabadi, H.; Najafi, M.; Samadian, H.; Azarnezhad, A.; Vahidi, H.; Mahjoub, M. A.; Koohiyan, M.; Ahmadi, A. A systematic review of the genotoxicity and antigenotoxicity of biologically synthesized metallic nanomaterials: Are green nanoparticles safe enough for clinical marketing? *Medicina.* **2019**, 55, 439.
- Bayda, S.; Adeel, M.; Tuccinardi, T.; Cordani, M.; Rizzolio, F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules* **2019**, 25, 112.
- Berekaa, Mahmoud M. Nanotechnology in food industry; advances in food processing, packaging and food safety. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **2015**, 4, 345–357.
- Bilal, Muhammad; Iqbal, Hafiz M. N. New insights on unique features and role of nanostructured materials in cosmetics. *Cosmetics* **2020**, 7, 24.
- Brandão, F.; Fernández-Bertólez, N.; Rosário, F.; Bessa, M. J.; Fraga, S.; Pásaro, E.; Teixeira, J. P.; Laffon, B.; Valdiglesias, V.; Costa, C. Genotoxicity of TiO₂ nanoparticles in four

- different human cell lines (A549, HEPG2, A172 and SH-SY5Y). *Nanomaterials* **2020**, *10*, 412.
- Chan V. S. Nanomedicine: an unresolved regulatory issue. *Regul. Toxicol. Pharm.* **2006**, *46*, 218–224.
- Charbgoon, F.; Ahmad, M. B.; Darroudi, M. Cerium oxide nanoparticles: green synthesis and biological applications. *Int. J. Nanom.* **2017**, *12*, 1401.
- Chen, T.; Yan, J.; Li, Y. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *J. Food Drug Anal.* **2014**, *22*, 95–104.
- Choi, S. J. & Choy, J. H. Biokinetics of zinc oxide nanoparticles: Toxicokinetics, biological fates, and protein interaction. *Int. J. Nanom.* **2014**, *9*, 261–269.
- Coetzee, D.; Venkataraman, M.; Militky, J.; Petru, M. Influence of nanoparticles on thermal and electrical conductivity of composites. *Polymers* **2020**, *12*, 742.
- Collins, A. R.; El Yamani, N.; Lorenzo, Y.; Shaposhnikov, S.; Brunborg, G.; Azqueta, A. Controlling variation in the comet assay. *Front. Genet.* **2014**, *5*, 359.
- Collins, A. R.; Oscoz, A. A.; Brunborg, G.; Gaivao, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Štětina, R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* **2008**, *23*, 143–151.
- Costa, C.; Brandão, F.; Bessa, M. J. M. J.; Costa, S.; Valdiglesias, V.; Kiliç, G.; Fernández-Bertólez, N.; Quaresma, P.; Pereira, E.; Pásaro, E.; Laffon, B.; Teixeira, J. P. J. P. In vitro cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on neuronal and glial cells. Evaluation of nanoparticle interference with viability tests. *J. Appl. Toxicol.* **2016**, *36*, 361–372.
- Costa, E. M.; Silva, S.; Veiga, M.; Baptista, P.; Tavaría, F. K.; Pintado, M. E. Textile dyes loaded chitosan nanoparticles: Characterization, biocompatibility and staining capacity. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *251*, 117120.
- Dale, J. G.; Cox, S. S.; Vance, M. E.; Marr, L. C.; Hochella, M. F. Jr. Transformation of cerium oxide nanoparticles from a diesel fuel additive during combustion in a diesel engine. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 1973–1980.
- De Marzi, L.; Monaco, A.; De Lapuente, J.; Ramos, D.; Borrás, M.; Di Gioacchino, M.; Santucci, S.; Poma, A. Cytotoxicity and genotoxicity of ceria nanoparticles on different cell lines in vitro. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 3065–3077.
- Demir, E. A review on nanotoxicity and nanogenotoxicity of different shapes of nanomaterials. *J. Appl. Toxicol.* **2020**, *41*, 118–147.

- Demir, E.; Akça, H.; Kaya, B.; Burgucu, D.; Tokgün, O.; Turna, F.; Aksakal, S.; Vales, G.; Creus, A.; Marcos, R. Zinc oxide nanoparticles: Genotoxicity, interactions with UV-light and cell-transforming potential. *J. Hazard. Mater.* **2014**, 264, 420–429.
- Dhawan, A.; Bajpayee, M.; Parmar, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol. Toxicol.* **2009**, 25, 5–32.
- Di Bucchianico, S.; Cappellini, F.; Le Bihanic, F.; Zhang, Y.; Dreij, K.; Karlsson, H. L. Genotoxicity of TiO₂ nanoparticles assessed by mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. *Mutagenesis* **2017**, 32, 127–137.
- Dorier, M.; Tisseyre, C.; Dussert, F.; Béal, D.; Arnal, M. E.; Douki, T.; Valdiglesias, V.; Laffon, B.; Fraga, S.; Brandão, F.; Herlin-Boime, N.; Barreau, F.; Rabilloud, T.; Carriere, M. Toxicological impact of acute exposure to E171 food additive and TiO₂ nanoparticles on a co-culture of Caco-2 and HT29-MTX intestinal cells. *Mutat. Res-Gen. Tox. En.* **2019**, 845, 402980–402980.
- Dréno, B.; Alexis, A.; Chuberre, B.; Marinovich, M. Safety of titanium dioxide nanoparticles in cosmetics. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2019**, 33, 34–46.
- Evans, S. J.; Clift, M. J.; Singh, N.; de Oliveira Mallia, J.; Burgum, M.; Wills, J. W.; Wilkinson, T. S.; Jenkins, G. J. S.; Doak, S. H. Critical review of the current and future challenges associated with advanced in vitro systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity. *Mutagenesis* **2017**, 32, 233–241.
- Falck, G. C. M.; Lindberg, H. K.; Suhonen, S.; Vippola, M.; Vanhala, E.; Catalán, J.; Savolainen, K.; Norppa, H. Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂. *Hum. Exp. Toxicol.* **2009**, 28, 339–352.
- Fernández-Bertólez, N.; Azqueta, A.; Pásaro, E.; Laffon, B.; Valdiglesias, V. Salivary leucocytes as suitable biomatrix for the comet assay in human biomonitoring studies. *Arch. Toxicol.* **2021**, 95, 2179–2187.
- Fernández-Bertólez, N.; Costa, C.; Brandão, F.; Kiliç, G.; Teixeira, J. P.; Pásaro, E.; Laffon, B.; Valdiglesias, V. Neurotoxicity assessment of oleic acid-coated iron oxide nanoparticles in SH-SY5Y cells. *Toxicology* **2018**, 406–407, 81–91.
- Gerloff et. al. Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells. *Nanotoxicology* **2009**, 3, 355–364.
- Ghosh, M.; Chakraborty, A.; Mukherjee, A. Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. *J. Appl. Toxicol.* **2013**, 33, 1097–1110.

- Gnach, A.; Lipinski, T.; Bednarkiewicz, A.; Rybka, J.; Capobianco, J. A. Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 1561–1584.
- Golbamaki, N.; Rasulev, B.; Cassano, A.; Marchese Robinson, R. L.; Benfenati, E.; Leszczynski, J.; Cronin, M. T. D. Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: review of recent data and discussion of possible mechanisms. *Nanoscale* **2015**, 7, 2154–2198.
- Guadagnini, R.; Halamoda Kenzaoui, B.; Walker, L.; Pojana, G.; Magdolenova, Z.; Bilanicova, D.; Saunders, M.; Juillerat-Jeanneret, L.; Marcomini, A.; Huk, A.; Dusinska, M.; Fjellsbo, L. M.; Marano, F.; Boland, S. Toxicity screenings of nanomaterials: Challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology* **2015**, 9, 13–24.
- Hansen, S. F.; Larse, B. H.; Olsen, S. I.; Baun, A. Categorization framework to aid hazard identification of nanomaterials. *Nanotoxicology* **2007**, 1, 243–250.
- Hussain, S.; Al-Nsour, F.; Rice, A. B.; Marshburn, J.; Yingling, B.; Ji, Z.; Zink, J. I.; Walker, N. J.; Garantzotis, S. Cerium dioxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human peripheral blood monocytes. *ACS Nano* **2012**, 6, 5820–5829.
- Hussain, S.; Kodavanti, P. P.; Marshburn, J. D.; Janoshazi, A.; Marinakos, S. M.; George, M.; Rice, A.; Wiesner, M. R.; Garantzotis, S. Decreased uptake and enhanced mitochondrial protection underlie reduced toxicity of nanocerium in human monocyte-derived macrophages. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2016**, 12, 2139–2150.
- International, A. **2012**. Standard terminology relating to nanotechnology. Disponible en: <https://www.astm.org/Standards/E2456.htm>. Fecha de última consulta: 13 de julio de 2021.
- Johnston, L. J.; Gonzalez-Rojano, N.; Wilkinson, K. J.; Xing, B. Key challenges for evaluation of the safety of engineered nanomaterials. *NanoImpact* **2020**, 18, 100219.
- Jugan, M. L.; Barillet, S.; Simon-Deckers, A.; Herlin-Boime, N.; Sauvaigo, S.; Douki, T.; Carriere, M. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology* **2012**, 6, 501–513.
- Kain, J.; Karlsson, H. L.; Moller, L. DNA damage induced by micro- and nanoparticles--interaction with FPG influences the detection of DNA oxidation in the comet assay. *Mutagenesis* **2012**, 27, 491–500.
- Kalpana, V. N. & Devi Rajeswari, V. A review on green synthesis, biomedical applications, and toxicity studies of ZnO NPs. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2018**, 3569758, 12.
- Karlsson, H. L. The comet assay in nanotoxicology research. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, 651–666.

- Könen-Adıgüzel, S.; Ergene, S. In vitro evaluation of the genotoxicity of CeO₂ nanoparticles in human peripheral blood lymphocytes using cytokinesis-block micronucleus test, comet assay, and gamma H2AX. *Toxicol. Ind. Health* **2018**, 34, 293–300.
- Kumari, M.; Singh, S. P.; Chinde, S.; Rahman, M. F.; Mahboob, M.; Grover, P. Toxicity study of cerium oxide nanoparticles in human neuroblastoma cells. *Int. J. Toxicol.* **2014**, 33, 86–97.
- Lallo da Silva, B.; Abuçafy, M. P.; Manaia, E. B.; Junior, J. A. O.; Chiari-Andréo, B. G.; Pietro, R. C. R.; Chiavacci, L. A. Relationship between structure and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles: An overview. *Int. J. Nanom.* **2019**, 14, 9395–9410.
- Magdolenova, Z.; Collins, A.; Kumar, A.; Dhawan, A.; Stone, V.; Dusinska, M. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* **2014**, 8, 233–278.
- Magdolenova, Z.; Lorenzo, Y.; Collins, A.; Dusinska, M. Can standard genotoxicity tests be applied to nanoparticles? *J. Tox. En. Health Part A* **2012**, 75, 800–806.
- Mishra, R.; Militky, J.; Baheti, V.; Huang, J.; Kale, B.; Venkataraman, M.; Bele, V.; Arumugam, V.; Zhu, G.; Wang, Y. The production, characterization and applications of nanoparticles in the textile industry. *Inventions* **2014**, 46, 133–226.
- Møller, P.; Azqueta, A.; Boutet-Robinet, E.; Koppen, G.; Bonassi, S.; Milić, M.; Gajski, G.; Costa, S.; Teixeira, J. P.; Costa Pereira, C.; Dusinska, M.; Godschalk, R.; Brunborg, G.; Gutzkow, K. B.; Giovannelli, L.; Cooke, M. S.; Richling, E.; Laffon, B.; Valdiglesias, V. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nat. Protoc.* **2020**, 15, 3817–3826.
- Mortezaee, K.; Najafi, M.; Samadian, H.; Barabadi, H.; Azarnezhad, A.; Ahmadi, A. Redox interactions and genotoxicity of metal-based nanoparticles: A comprehensive review. *Chem.-Biol. Interact.* **2019**, 108814.
- National Nanotechnology Initiative (NNI). Disponible en: www.nano.gov. Fecha de última consulta: 4 de mayo de 2021.
- Naz, S.; Beach, J.; Heckert, B.; Tummala, T.; Pashchenko, O.; Banerjee, T.; Santra, S. Cerium oxide nanoparticles: a 'radical' approach to neurodegenerative disease treatment. *Nanomedicine (Lond.)* **2017**, 12, 545–553.
- Östling, O. & Johanson, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1984**, 123, 291–298.
- Pelaz, B.; Alexiou, C.; Alvarez-Puebla, R. A.; Alves, F.; Andrews, A. M.; Ashraf, S.; Parak, W. J. Diverse applications of nanomedicine. *ACS nano* **2017**, 11, 2313–2381.

- Petersen, E. J.; Hirsch, C.; Elliott, J. T.; Krug, H. F.; Aengenheister, L.; Arif, A. T.; Bogni, A.; Kinsner-Ovaskainen, A.; May, S.; Walser, T.; Wick, P.; Roesslein, M. Cause-and-effect analysis as a tool to improve the reproducibility of nanobioassays: four case studies. *Chem. Res. Toxicol.* **2020**, 33, 1039–1054.
- Pierscionek, B. K.; Li, Y.; Yasseen, A. A.; Colhoun, L. M.; Schachar, R. A.; Chen, W. Nanoceria have no genotoxic effect on human lens epithelial cells. *Nanotechnology* **2010**, 21.
- Róz, A. L.; Leite, F. D. L.; Ferreira, M.; Oliveira Jr, O. N. Nanoestruturas: princípios e aplicações. *Elsevier* **2015**, 1.
- Russo, C.; Acito, M.; Fatigoni, C.; Villarini, M.; Moretti, M. B-comet assay (Comet assay on buccal cells) for the evaluation of primary dna damage in human biomonitoring studies. *Int. J. Environ. Res. Pu.* **2020**, 17, 1–14.
- Sengul, A.B. & Asmatulu, E. Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: A review. *Environ. Chem. Lett.* **2020**, 18, 1659–1683.
- Shafiq, M. An overview of the applications of nanomaterials and nanodevices in the food industry. *Foods (Basel, Switzerland)* **2020**, 9, 148.
- Shi, H.; Magaye, R.; Castranova, V.; Zhao, J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part. Fibre. Toxicol.* **2013**, 10, 15.
- Smijs, T. G. & Pavel, S. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2011**, 4, 95–112.
- Smith, C. C.; O'Donovan, M. R.; Martin, E. A. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* **2006**, 21, 185–190.
- Sohal, I. S.; O'Fallon, K. S.; Gaines, P.; Demokritou, P.; Bello, D. Ingested engineered nanomaterials: state of science in nanotoxicity testing and future research needs. *Part. Fibre Toxicol.* **2018**, 15.
- Srivastava, R.; Mishra, N.; Singh, U. M. Genotoxicity: mechanisms and its impact on human diseases. *Octa J. Biosci.* **2016**, 4, 67–70.
- Stone, V.; Nowack, B.; Baun, A.; Van Den Brink, N.; Kammer, F.; Dusinska, M.; et. al. Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physicochemical characterisation. *Sci. Total Environ.* **2010**, 408, 1745–1754.
- Sudha, P. N.; Sangeetha, K.; Vijayalakshmi, K.; Barhoum, A. Chapter 12: Nanomaterials history, classification, unique properties, production and market. Emerging applications of nanoparticles and architecture nanostructures, *Elsevier* **2018**, 1st Edition, 341–384.

- Taurozzi, J. S.; Hackley, V. A.; Wiesner, M. R. A standardised approach for the dispersion of titanium dioxide nanoparticles in biological media. *Nanotoxicology* **2013**, 7, 389–401.
- Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J. C.; Sasaki, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **2000**, 35, 206–221.
- Valdiglesias, V.; Costa, C.; Kiliç, G.; Costa, S.; Pásaro, E.; Laffon, B.; Teixeira, J. P.; Paulo, J. Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. *Environ. Int.* **2013a**, 55, 92–100.
- Valdiglesias, V.; Costa, C.; Sharma, V.; Kiliç, G.; Pásaro, E.; Teixeira, J. P.; Dhawan, A.; Laffon, B. Comparative study on effects of two different types of titanium dioxide nanoparticles on human neuronal cells. *Food Chem. Toxicol. J.* **2013b**, 57, 352–361.
- Valenzuela-Bustamante, M.; Dupré, E.; del Río-Portilla, M. A.; Gallardo-Escárate, C. Evaluación de integridad genómica en espermatozoides de *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) mediante ensayo cometa. *Gayana (Concepción)* **2008**, 72, 36–44.
- Vance, M. E.; Kuiken, T.; Vejerano, E. P.; McGinnis, S. P.; Hochella, M. F.; Rejeski, D.; Hull, M. S. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotech.* **2015**, 6, 1769–1780.
- Walkey, C.; Das, S.; Seal, S.; Erlichman, J.; Heckman, K.; Ghibelli, L.; Traversa, E.; McGinnis, J. F.; Self, W. T. Catalytic properties and biomedical applications of cerium oxide nanoparticles. *Environ. Sci. Nano* **2015**, 2, 33–53.
- Warheit, D. B. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol. Sci.* **2008**, 101, 183–185.
- Xia, T.; Kovoichich, M.; Liong, M.; Mädler, L.; Gilbert, B.; Shi, H.; Yeh, J. I.; Zink, J. I.; Nel, A. E. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* **2014**, 2, 2121–2134.
- Yamani, N. El; Collins, A. R.; Rundén-Pran, E.; Fjellsbø, L. M.; Shaposhnikov, S.; Zienolddiny, S.; Dusinska, M. In vitro genotoxicity testing of four reference metal nanomaterials, titanium dioxide, zinc oxide, cerium oxide and silver: Towards reliable hazard assessment. *Mutagenesis* **2017**, 32, 117–126.
- Zhu, M.; Nie, G.; Meng, H.; Xia, T.; Nel, A.; Zhao, Y. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. *Accounts Chem. Res.* **2013**, 46, 622–31.
- Ziental, D.; Czarczynska-Goslinska, B.; Mlynarczyk, D. T.; Glowacka-Sobotta, A.; Stanisiz, B.; Goslinski, T.; Sobotta, L. Titanium dioxide nanoparticles: prospects and applications in medicine. *Nanomaterials* **2020**, 10, 387.